

(19) Organisation Mondiale de la Propriété
Intellectuelle
Bureau international



(43) Date de la publication internationale
22 janvier 2004 (22.01.2004)

PCT

(10) Numéro de publication internationale
WO 2004/007548 A1

(51) Classification internationale des brevets⁷ :

C07K 14/47, C12N 9/64, 15/52,
C07K 19/00, 16/40, C07H 21/00, A61K 38/48, 31/711,
A61P 17/00, 31/00, A61K 48/00, 31/708

(21) Numéro de la demande internationale :

PCT/FR2003/002151

(22) Date de dépôt international : 9 juillet 2003 (09.07.2003)

(25) Langue de dépôt :

français

(26) Langue de publication :

français

(30) Données relatives à la priorité :

02/08613 9 juillet 2002 (09.07.2002) FR

(71) Déposant (pour tous les États désignés sauf US) :
L'OREAL [FR/FR]; 14 rue Royale, F-75008 PARIS (FR).

(72) Inventeurs; et

(75) Inventeurs/Déposants (pour US seulement) :
BERNARD, Dominique [FR/FR]; 4 rue du Sommet
des Alpes, F-75015 PARIS (FR). MEHUL, Bruno
[FR/FR]; 2 place de La Fontaine, F-92800 VILLEJUIF
(FR).

(74) Mandataire : NONY & ASSOCIES; 3, rue de Penthièvre,
F-75008 PARIS (FR).

(81) États désignés (national) : AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ,
BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ,
DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM,
HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK,
LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX,
MZ, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD,
SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG,
US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) États désignés (régional) : brevet ARIPO (GH, GM, KE,
LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), brevet
eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet
européen (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI,
FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK,
TR), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ,
GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publiée :

- avec rapport de recherche internationale
- avant l'expiration du délai prévu pour la modification des
revendications, sera republiée si des modifications sont re-
çues

En ce qui concerne les codes à deux lettres et autres abrégia-
tions, se référer aux "Notes explicatives relatives aux codes et
abréviations" figurant au début de chaque numéro ordinaire de
la Gazette du PCT.

(54) Title: USE OF ASPARTIC PROTEASES IN COSMETICS AND THERAPEUTICS

(54) Titre : UTILISATION DE PROTEASES ASPARTIQUES DANS LE DOMAINE COSMETIQUE ET THERAPEUTIQUE

(57) Abstract: The invention concerns a cosmetic or pharmaceutical composition comprising in a physiologically acceptable medium, at least one purified natural or synthetic polypeptide whereof the peptide sequence is represented wholly or partly by at least one sequence selected among: SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 25 and SEQ ID NO: 27 and their homologues.

(57) Abrégé : La présente invention concerne une composition cosmétique ou pharmaceutique comprenant dans un milieu physio-
logiquement acceptable, au moins un polypeptide naturel ou synthétique purifié dont la séquence peptidique est représentée en tout
ou partie par au moins une séquence choisie parmi SEQ ID NO : 1, SEQ ID NO : 4, SEQ ID NO : 5, SEQ ID NO : 6, SEQ ID NO :
7, SEQ ID NO : 8, SEQ ID NO : 9, SEQ ID NO : 16, SEQ ID NO : 25 et SEQ ID NO : 27 et leurs homologues.

UTILISATION DE PROTEASES ASPARTIQUES
DANS LE DOMAINE COSMETIQUE ET THERAPEUTIQUE

La présente invention a pour objet principal l'utilisation, dans les domaines cosmétique et thérapeutique, d'une nouvelle protéase à acide aspartique dite SASPase, des formes tronquées ou dérivées de ladite protéine ou d'un mélange de polypeptides issu de sa
5 protéolyse notamment en vue de traiter les troubles liés à un dysfonctionnement de la prolifération et/ou de la différenciation cellulaire.

L'invention a également pour objet des séquences d'acide désoxyribonucléique codant ladite protéase à acide aspartique SASPase et ses formes dites activées, les
10 séquences polypeptidiques correspondantes et les utilisations desdites séquences désoxyribonucléiques.

Les protéases sont des enzymes hydrolytiques capables de couper des liaisons peptidiques. Un certain nombre d'entre elles sont aujourd'hui connues comme jouant un rôle essentiel au niveau de l'équilibre et de la physiologie de l'épiderme.

L'épiderme est conventionnellement divisé en une couche basale de
15 kératinocytes constituant la couche germinative de l'épiderme, une couche dite épineuse constituée de plusieurs couches de cellules polyédriques disposées sur les couches germinatives, une à trois couches dites granuleuses constituées de cellules aplaties contenant des inclusions cytoplasmiques distinctes, les grains de kératohyaline et enfin, un
20 ensemble de couches supérieures appelées couches cornées (ou *stratum corneum*), constituée de kératinocytes au stade terminal de leur différenciation appelés cornéocytes.

Les cornéocytes sont des cellules anucléées principalement constituées d'une matière fibreuse contenant des cytokératines, entourée d'une enveloppe cornée. Il y a en permanence production de nouveaux kératinocytes pour compenser la perte en continu de
25 cellules épidermiques au niveau de la couche cornée selon un mécanisme dénommé desquamation. Un déséquilibre entre la production des cellules au niveau de la couche basale et le taux de desquamation peut notamment conduire à des formations d'écailles à la surface de la peau.

En l'occurrence, de nombreuses pathologies cutanées se caractérisent par la
30 production d'une couche cornée épaissie et par une desquamation anormale, c'est-à-dire par une hyperkératose. A titre d'exemple, on peut citer :

- la xérose (ou sécheresse cutanée),

- les ichthyoses,
- le psoriasis,
- certaines lésions tumorales bénignes ou malignes, et
- les hyperkératoses réactionnelles.

5 A l'inverse, certaines manifestations pathologiques entraînent un amincissement de l'épiderme et plus particulièrement de la couche cornée. Ce type de manifestations se traduit alors par une fragilité excessive du revêtement cutané. A titre représentatif de ces troubles, on peut notamment citer les réactions d'origine immunitaire généralement induites par mise en présence ou contact avec un ou plusieurs agents
10 exogènes.

En conséquence, la connaissance des polypeptides impliqués dans la cohésion inter cornéocytaire est une des voies qui peut permettre l'élaboration de produits destinés à lutter contre les effets d'un excès ou d'un défaut en polypeptide(s) de ce type, en particulier à la surface de la peau.

15 L'un des objets de l'invention est précisément de proposer l'utilisation dans un but cosmétique et/ou thérapeutique d'un polypeptide impliqué dans la régulation du phénomène de différenciation/prolifération épidermique.

Plus précisément, les inventeurs ont mis en évidence dans des kératinocytes humains, isolé et purifié un polypeptide possédant dans sa séquence peptidique
20 (SEQ ID NO 5), la séquence FLVDSGAQVSVV (SEQ ID NO : 1) correspondant à une signature PROSITE PS00141 des sites actifs des protéases de la famille des protéases dites à acide aspartique.

Ce polypeptide encore dénommé ci-après protéine SASPase, est par ailleurs caractérisé par la présence dans sa séquence peptidique des séquences suivantes :

- 25
- AQFLVANASAEAAIGTDVLQ (SEQ ID NO : 2) et
 - ILGVWDTAV (SEQ ID NO : 3).

De manière inattendue les inventeurs ont mis en évidence que la protéine représentée par la séquence SEQ ID NO : 5, encore appelée protéine SASPase, possédait une activité protéolytique significative et ont notamment constaté cette activité vis-à-vis de
30 la caséine et de l'insuline comme le montre les exemples ci-après.

Ils ont par ailleurs observé que cette protéine SASPase était autocatalytique et générait à un pH compris entre 3 et 7, et de préférence supérieur ou égal à 4,5 une forme

tronquée dite « SASPase activée », correspondant à la séquence SEQ ID NO : 6 capable à son tour de se dimériser.

Un aspect de l'invention concerne donc un polypeptide isolé et purifié, appartenant à la famille des protéases à acide aspartique caractérisé en ce qu'il possède une
5 séquence peptidique représentée par la séquence SEQ ID NO : 6, SEQ ID NO : 16, SEQ ID NO : 25 ou SEQ ID NO : 27.

La SEQ ID NO : 6 correspond à une forme activée de la SEQ ID NO : 5.

La SEQ ID NO : 16 correspond à la séquence SEQ ID NO : 6 déléetée de ses deux premiers acides aminés.

10 La séquence SEQ ID NO : 25 est une autre forme activée de la SEQ ID NO : 5. Elle est obtenue à partir d'une forme tronquée de la SASPase (SEQ ID NO : 36) déléetée du site codant pour la séquence FANS (SEQ ID NO : 29). Elle est plus particulièrement générée à pH 5.00 dans du tampon acétate.

15 La séquence SEQ ID NO : 27 correspond à la séquence SEQ ID NO : 25 déléetée d'une partie de son fragment C-terminal.

D'une façon générale, l'invention s'étend à toutes les formes homologues des différents polypeptides ou séquences peptidiques cités. Classiquement, on entend par homologue d'un polypeptide ou d'une séquence peptidique, tout polypeptide ou toute
20 séquence peptidique ayant une homologie de séquence d'au moins 85 %, notamment d'au moins 90 % et en particulier d'au moins 95 % et ayant le cas échéant le même type d'activité biologique que ledit polypeptide ou que ladite séquence peptidique.

Ces formes homologues englobent les variants définis ci-après.

L'invention s'étend en particulier aux formes homologues des polypeptides cités précédemment, c'est-à-dire manifestant la même activité biologique et possédant au
25 moins 85 %, notamment au moins 90 % et en particulier au moins 95 % d'homologie de séquence avec la séquence SEQ ID NO : 6, SEQ ID NO : 16, SEQ ID NO : 25 ou SEQ ID NO : 27.

De même, l'invention s'étend aux protéines possédant au moins une homologie de 30 % avec la séquence de SEQ ID NO : 6, SEQ ID NO : 16, SEQ ID NO : 25 à la
30 condition que l'homologie avec la séquence du site actif SEQ ID NO : 1 contenue dans les SEQ ID NO : 6, SEQ ID NO : 16, SEQ ID NO : 25 et SEQ ID NO : 27 soit d'au moins 80 %.

L'invention s'étend également aux protéines possédant à la fois le motif "aspartyl protéase rétroviral type" défini sous la référence de motif PROSITE : PS50175 ainsi qu'au moins un domaine transmembranaire tel que prédit par les algorithmes reconnus pour une telle détection parmi lesquels on peut citer: PRED-TMR2, TMHMM, TMpred et

5 SOSUL

Les modifications, dites encore mutations ou variations selon l'invention peuvent dériver, soit de la délétion d'un ou plusieurs acides aminés de la séquence SEQ ID NO : 6, SEQ ID NO : 16, SEQ ID NO : 25 ou SEQ ID NO : 27, ou de l'addition d'un ou plusieurs acides aminés à la séquence SEQ ID NO : 6, SEQ ID NO : 16, SEQ ID NO : 25

10 ou SEQ ID NO : 27, soit encore de la substitution d'un ou plusieurs acides aminés à la séquence SEQ ID NO : 6, SEQ ID NO : 16, SEQ ID NO : 25 ou SEQ ID NO : 27. Les séquences correspondantes sont encore désignées sous le terme de variants dans le cadre de la présente invention.

A titre illustratif des variants de délétion on peut plus particulièrement citer les

15 séquences peptidiques suivantes :

La séquence SEQ ID NO : 4 correspondant à la SEQ ID NO : 5 tronquée de son fragment N-terminal Δ 1-84.

La séquence SEQ ID NO : 7 correspondant à la séquence de la partie N-terminale de la protéine SASPase (SEQ ID NO : 5). L'interaction de ce fragment avec

20 un ligand biologique pourrait être une étape importante pour l'activation de la protéine SASPase et notamment la génération de sa forme activée (SEQ ID NO : 6).

La séquence SEQ ID NO : 8 correspondant à la séquence de la partie dite transmembranaire de la protéine SASPase (SEQ ID NO : 5).

La séquence SEQ ID NO : 9 correspondant à la séquence d'un peptide issu de

25 la partie C-terminale de la protéine SASPase (SEQ ID NO : 5).

Les séquences SEQ ID NO : 29 et SEQ ID NO 30 correspondent à deux sites d'activation.

Sont également couverts sous le terme de variant, les protéines de fusion de la

30 protéine SASPase (SEQ ID NO : 5), de ses formes activées SEQ ID NO : 6, SEQ ID NO : 16, SEQ ID NO : 25 ou SEQ ID NO : 27 avec un autre polypeptide, un agent de ciblage hydrophile ou hydrophobe ou un précurseur de bioconversion susceptible

notamment de contrôler l'activation de ladite protéine.

Il est connu que les polypeptides peuvent subir des modifications post-traductionnelles comme la formation de liaisons disulfures, les clivages protéolytiques spécifiques, l'addition de glucides (glycosylation), la phosphorylation en particulier au
5 niveau des sérines et/ou des thréonines et/ou des tyrosines, et/ou l'association à des lipides.

Le polypeptide de l'invention peut avoir subi une ou plusieurs modifications post-traductionnelles. En particulier, les polypeptides selon l'invention peuvent être N-glycosylés, phosphorylés, myristoylés, amidés et/ou citrullinés.

Ainsi, l'invention concerne également les polypeptides revendiqués ayant subi
10 ou non des modifications post-traductionnelles.

L'invention s'étend également aux formes multimères et de préférence à la forme dimère de la séquence peptidique SEQ ID NO : 6, SEQ ID NO : 16, SEQ ID NO : 25 ou SEQ ID NO : 27. La forme dimère de la séquence peptidique SEQ ID NO : 6 est en particulier caractérisée en exemple V ci-après. Elle peut notamment
15 être obtenue par association moléculaire de la forme monomérique ou par expression de son ADNc codant pour le dimère actif, incorporant à titre d'agent de liaison entre les deux entités monomériques, un motif composé de 2 à 6 acides aminés.

Les polypeptides revendiqués peuvent être d'origine naturelle ou synthétique. Par synthétique, on entend ici tout polypeptide obtenu chimiquement ou par production
20 dans un organisme après introduction dans cet organisme des éléments nécessaires à cette production.

Ils peuvent être issus de toute origine possible à savoir soit animale, en particulier de mammifères et encore plus particulièrement humaine, soit végétale, soit de micro-organismes (par exemple virus, phages, bactéries, levures entre autres) ou encore de
25 champignons, ou issu d'une surexpression dans un système eucaryote, par exemple une cellule de mammifère, sans préjuger du fait qu'ils soient présents de manière naturelle ou non dans ledit organisme d'origine.

En particulier, les polypeptides conformes à l'invention sont d'origine naturelle, purifiés à partir de tissus de mammifères, plus particulièrement à partir de peau
30 de mammifères.

En particulier, ils sont purifiés à partir de peau humaine et encore plus particulièrement à partir d'épiderme humain.

On sait que dans un polypeptide, un ou plusieurs résidus d'acide aminé peuvent être remplacés par des résidus d'acide aminé ayant un indice hydrophatique similaire sans pour autant changer les propriétés biologiques du polypeptide.

5 L'indice hydrophatique est un indice attribué aux acides aminés en fonction de leur hydrophobicité et de leur charge (Kyte *et al.* (1982), J. Mol. Biol., 157 : 105).

Ainsi l'invention a également pour objet un polypeptide tel que décrit ci-dessus dans lequel un résidu d'acide aminé au moins a été remplacé par un résidu d'acide aminé ayant un indice hydrophatique similaire.

10 On peut également classer les polypeptides en fonction de leur point isoélectrique.

Le point isoélectrique théorique d'un polypeptide peut être déduit de son enchaînement en acides aminés. Les polypeptides de l'invention sont théoriquement des polypeptides acides.

15 Ainsi les polypeptides de séquence SEQ ID NO : 5, SEQ ID NO : 6 ou SEQ ID NO : 16 possèdent un point isoélectrique compris entre 3 et 9, plus particulièrement entre 4 et 6 et notamment d'environ 5,8.

20 On sait en outre que la séquence primaire en acides aminés ainsi que les diverses modifications post-traductionnelles subies par un polypeptide font que ledit polypeptide peut être caractérisé par sa masse moléculaire apparente exprimée en kilodaltons.

On entend par masse moléculaire apparente, la masse moléculaire obtenue pour le polypeptide par comparaison de la mobilité électrophorétique de celui-ci avec celles de protéines standards de poids moléculaires connus sur gel de polyacrylamide/sodium dodécylsulfate, ou encore par comparaison du volume d'élution du polypeptide avec celui de protéines standard de poids moléculaires connus en chromatographie d'exclusion (selon les techniques décrites dans « Protein Purification », J-C. Janson et L. Ryden, VCH Publisher Inc. N.Y., 1989). (La méthode retenue dans le cadre de l'invention est celle reposant sur la mobilité électrophorétique).

30 La connaissance de l'enchaînement en acides aminés du polypeptide de l'invention permet d'en déterminer le poids moléculaire théorique.

L'invention concerne donc un polypeptide de séquence SEQ ID NO : 6 ayant une masse moléculaire apparente comprise entre 5 et 30 kilodaltons (kD), notamment entre

9 et 15 kD, et plus particulièrement entre 11 et 14 kD. En particulier, ce polypeptide de l'invention a une masse moléculaire apparente de l'ordre de 12kD.

Comme il ressort des exemples présentés ci-après, les inventeurs ont caractérisé l'expression du polypeptide dont la séquence est représentée par la séquence
5 SEQ ID NO : 5 dans un grand nombre de tissus biologiques humains tel que le foie foetal, le placenta, le muscle, le poumon, l'intestin grêle et surtout au niveau du cerveau et du cœur et plus particulièrement au niveau de l'épiderme où l'expression est particulièrement élevée.

Il a par ailleurs été constaté que la SASPase de séquence SEQ ID NO : 5
10 dégradait la cornéodesmosine, qui est un marqueur de la desquamation.

Enfin, la présence, dans la séquence polypeptidique de la SASPase (SEQ ID NO : 5) d'un site autocatalytique correspondant à un site décrit pour la protéase de type matrilysine capable d'activer les MMP de type 1, 2, et 9, témoigne d'une activité potentielle de la SASPase, ainsi que de ses formes activées (SEQ ID NO : 6,
15 SEQ ID NO : 16, SEQ ID NO : 25 ou SEQ ID NO : 27) ou de ses fragments, sur des substrats endogènes et donc d'applications potentielles en cicatrisation, ré-épithialisation, vieillissement, angiogénèse et cancérisation (processus d'invasion) pour ladite protéine et ses différentes formes activées ou fragments.

L'ensemble de ces informations, valide donc l'implication du polypeptide
20 conforme à l'invention dans le processus de prolifération et/ou différenciation cellulaire et identifie celui-ci en tant que nouvelle cible dermato/cosmétologique et thérapeutique.

En conséquence, un second aspect de l'invention concerne une composition cosmétique ou pharmaceutique comprenant, dans un milieu physiologiquement acceptable, au moins un polypeptide naturel ou synthétique purifié dont la séquence comprend au
25 moins une séquence peptidique représentée en tout ou partie par au moins une séquence choisie parmi SEQ ID NO : 1, SEQ ID NO : 4, SEQ ID NO : 5, SEQ ID NO : 6, SEQ ID NO : 7, SEQ ID NO : 8, SEQ ID NO : 9, SEQ ID NO : 16, SEQ ID NO : 25 et SEQ ID NO : 27 et leurs homologues.

En particulier, la présente invention concerne une composition cosmétique ou
30 pharmaceutique comprenant, dans un milieu physiologiquement acceptable, au moins un polypeptide naturel ou synthétique purifié dont la séquence peptidique est représentée en tout ou partie par la séquence SEQ ID NO : 5, SEQ ID NO : 6, SEQ ID NO : 7,

SEQ ID NO : 16 ou SEQ ID NO : 25 ou SEQ ID NO : 27 ou leurs homologues, et en particulier qui est représentée par la séquence peptidique SEQ ID NO : 5, SEQ ID NO : 6, SEQ ID NO : 7, SEQ ID NO : 16, SEQ ID NO : 25 ou SEQ ID NO : 27.

La présente invention concerne également une composition cosmétique ou pharmaceutique comprenant au moins un polypeptide naturel ou synthétique purifié dont la séquence peptidique est représentée en tout ou partie par au moins une séquence choisie parmi SEQ ID NO : 1, SEQ ID NO : 4, SEQ ID NO : 5, SEQ ID NO : 6, SEQ ID NO : 7, SEQ ID NO : 8, SEQ ID NO : 9, SEQ ID NO : 16, SEQ ID NO : 25 et SEQ ID NO : 27 et leurs homologues et en particulier au moins un polypeptide de séquence SEQ ID NO : 5, SEQ ID NO : 6, SEQ ID NO : 7, SEQ ID NO : 16, SEQ ID NO : 25 ou SEQ ID NO : 27 sous une forme multimère et de préférence dimère.

Au sens de l'invention, et sans indication contraire, on entend couvrir sous le terme polypeptide dans les compositions revendiquées les polypeptides naturels ou synthétiques, qu'il soit obtenu par protéolyse ou par synthèse, les différentes formes post-traductionnelles de ceux-ci et notamment celles décrites précédemment ou encore tout polypeptide naturel ou synthétique dont la séquence est totalement ou partiellement constituée par les séquences précitées comme par exemple les variants décrits ci-dessus.

La présente invention concerne également une composition cosmétique ou pharmaceutique dans laquelle ledit polypeptide se présente sous la forme d'un polypeptide de séquence SEQ ID NO : 5, SEQ ID NO : 6, SEQ ID NO : 7, SEQ ID NO : 16, SEQ ID NO : 25 ou SEQ ID NO : 27 fusionné avec un autre polypeptide, un agent de ciblage hydrophile ou hydrophobe ou un précurseur de bioconversion.

Il est par ailleurs connu que la séquence primaire en acides aminés d'un polypeptide détermine des sites spécifiquement reconnus par les protéases qui, une fois la reconnaissance de ces sites effective vont, avec ou sans fixation audit polypeptide, induire son clivage par protéolyse.

En conséquence, l'invention vise également une composition cosmétique ou pharmaceutique comprenant dans un milieu physiologiquement acceptable au moins un mélange de polypeptides issu de la protéolyse d'un polypeptide dont la séquence est représentée en tout ou partie par la séquence SEQ ID NO : 5, SEQ ID NO : 6, SEQ ID NO : 7, SEQ ID NO : 16, SEQ ID NO : 25 ou SEQ ID NO : 27 ou leurs homologues et plus particulièrement, dont la séquence est représentée par SEQ ID NO : 5,

SEQ ID NO : 6, SEQ ID NO : 7, SEQ ID NO : 16, SEQ ID NO : 25 ou SEQ ID NO : 27.

La quantité de polypeptide contenue dans les compositions de l'invention est, bien entendu, fonction de l'effet recherché et peut donc varier dans une large mesure.

Pour donner un ordre de grandeur, la composition peut contenir un polypeptide
5 conforme à l'invention en une quantité représentant de 0,00001 % à 50 % du poids total de la composition et préférentiellement en une quantité représentant de 0,001 % à 10 % du poids total de la composition et encore plus préférentiellement en une quantité représentant de 0,1 % à 1 % du poids total de la composition.

Comme décrit précédemment, un certain nombre de désordres sont associés à
10 des troubles de différenciation et/ou prolifération cellulaire. Dans la mesure où les polypeptides conformes à l'invention sont impliqués au niveau de la régulation de ces deux phénomènes, ils constituent avantageusement des cibles potentielles pour traiter tout désordre résultant d'un dysfonctionnement de la prolifération ou de la différenciation cellulaires en particulier épidermiques. En conséquence, outre le fait que les polypeptides
15 selon l'invention peuvent être utilisés directement à titre de matière active dans une composition cosmétique ou pharmaceutique, ils peuvent également eux-mêmes servir de cible dans un traitement cosmétique ou pharmaceutique ou être utilisés à titre d'outils de diagnostic.

Les inventeurs ont par ailleurs caractérisé la présence de sites de coupure dans
20 la séquence peptidique SEQ ID NO : 5, en partie localisés dans sa partie N-terminale et également présents dans les formes actives SEQ ID NO : 6, et SEQ ID NO : 16 et en partie présents dans sa partie C-terminale et également présents dans les formes actives SEQ ID NO : 25 et SEQ ID NO : 27. Plus précisément, les sites de coupure déduits de l'autoactivation de la SASPase elle-même sont F/A, N/S, E/L, A/L, R/F, H/S, F/E, E/A. A
25 l'évidence, ces sites de coupure peuvent être déterminants au niveau de l'activation de la protéine, soit pour la bloquer, soit au contraire pour activer son hydrolyse.

Les sites pertinents plus précisément localisés dans la région N-terminale sont F/A et N/S et figurent dans la séquence FANS dite SEQ ID NO : 29. Ils semblent en particulier impliqués dans la génération de la forme activée représentée par la
30 SEQ ID NO : 25.

En ce qui concerne la seconde région potentielle d'activation ou d'inactivation de la protéine SASPase SEQ ID NO : 5, elle correspond plus particulièrement à la

séquence DLELIE dite SEQ ID NO : 30 et comprend notamment le site de coupure E/L.

A partir de ces sites de coupure, on peut envisager d'effectuer la synthèse de différents types de peptides soit modifiés, soit portant un fluorophore quenché et qui serviront de substrat ou d'inhibiteurs.

5 Le minimum de séquence utilisable est évidemment le dipeptide (acides aminés de part et d'autre du site de coupure) mais en général on utilise des peptides de 8 à 12 acides aminés où le site de coupure est en position centrale. Par exemple, on sait que la SASPase coupe l'insuline en position E/A. On peut donc imaginer de développer un substrat de type peptidique incorporant ce site de coupure en le modifiant chimiquement à
10 chacune de ses extrémités par un groupement fluorophore quenché de type : Abz(NO₂)Tyr (extrémité-N : acide aminobenzoïque : extrémité-C : nitrotyrosine (amide)). L'hydrolyse de ce peptide par la protéase séparera le fluorophore et le quencheur et sera donc suivi par un accroissement de la fluorescence.

15 Un autre couple chimique tel que Dabcyl/EDANS peut être utilisé pour créer un autre type de substrat quenché.

On peut également envisager un substrat chromogénique en couplant le peptide avec le groupement paranitroanilide.

20 De la même façon, on peut envisager de développer un inhibiteur spécifique de la SASPase en remplaçant l'un des acides aminés d'un tel peptide, en modifiant la liaison peptidique ou en rajoutant un groupement chimique afin que la liaison soit rendue non hydrolysable par l'enzyme mais que le peptide ait toujours une affinité pour le site actif. Par exemple, on ajoute un acide aminé non naturel, on réduit la liaison peptide ou on ajoute des groupements chimiques de type aldéhyde, chlorométhyl-ketone ou diazométhyl-cétone.

25 Les inventeurs ont notamment montré que des modifications ponctuelles apportées au niveau du substrat peptidique figuré par SEQ ID NO : 30 pouvaient avoir un effet significatif au niveau de leur affinité pour l'enzyme.

Plus précisément, les séquences correspondantes modifiées s'avèrent susceptibles de constituer des inhibiteurs ou activateurs potentiels de la SASPase.

30 A titre illustratif de ces modulateurs potentiels, on peut plus particulièrement proposer des substrats peptidiques possédant au moins les séquences suivantes :

EFDLELIEED SEQ ID NO : 31

EFDLDLIEED SEQ ID NO : 32

EFDLDLIEWD

SEQ ID NO : 33

EFDLDLIHWD

SEQ ID NO : 34

EPNLDLIEED

SEQ ID NO : 35

5 Il a en particulier été constaté un effet activateur des substrats représentés par les séquences SEQ ID NO : 31 et SEQ ID NO : 32.

En conséquence, la présente invention concerne également l'utilisation d'un composé chimique ou biologique pour la préparation d'une composition destinée à interagir avec un polypeptide dont la séquence peptidique comprend au moins une
10 séquence choisie parmi SEQ ID NO : 1, SEQ ID NO : 4, SEQ ID NO : 5, SEQ ID NO : 6, SEQ ID NO : 7, SEQ ID NO : 8, SEQ ID NO : 9, SEQ ID NO : 16, SEQ ID NO : 25, SEQ ID NO : 27 et SEQ ID NO : 30 et leurs homologues et plus particulièrement avec un polypeptide de séquence SEQ ID NO : 5, SEQ ID NO : 6, SEQ ID NO : 7, SEQ ID NO : 16, SEQ ID NO : 25, SEQ ID NO : 27 ou SEQ ID NO : 30 ou d'en moduler l'activité
15 biologique.

Ce composé biologique peut notamment être une protéase présentant un site spécifique de reconnaissance et/ou de fixation et de coupure au sein de la séquence d'acides aminés dudit polypeptide et de préférence d'un polypeptide ayant comme séquence primaire la séquence SEQ ID NO : 5, SEQ ID NO : 6, SEQ ID NO : 7,
20 SEQ ID NO : 16 ou SEQ ID NO : 25 ou SEQ ID NO : 27.

En l'occurrence, il a été montré que des inhibiteurs de protéases de type rétropepsines manifestaient également un effet vis-à-vis de l'activité de la protéine SASPase. A titre illustratif des inhibiteurs pouvant être utilisés selon l'invention, on peut notamment citer les inhibiteurs de rétropepsines, notamment commercialisés par Bachem.

25 Cet inhibiteur peut également être sélectionné pour interférer sur la dimérisation de la SASPase (SEQ ID NO : 5) ou de l'une de ses formes activées représentées par SEQ ID NO : 6, SEQ ID NO : 16, SEQ ID NO : 25 ou SEQ ID NO : 27, préalablement à son activité protéolytique. Cet inhibiteur peut également être un inhibiteur endogène capable d'inhiber spécifiquement la SASPase ou son autoactivation.

30 De même, ce composé biologique peut être un activateur. A titre représentatif de ceux-ci on peut notamment citer le modulateur de rétropepsine RP3 caractérisé en exemple VIII ci-après.

Il peut également s'agir d'un anticorps spécifique dudit polypeptide.

De même, la présente invention s'étend à l'utilisation d'un composé biologique ou chimique pour la préparation d'une composition destinée à inhiber la dimérisation du polypeptide de séquence SEQ ID NO : 5, SEQ ID NO : 6, SEQ ID NO : 7, SEQ ID NO : 16, SEQ ID NO : 25 ou SEQ ID NO : 27.

La présente invention a également pour objet l'utilisation d'un polypeptide dont la séquence comprend au moins et en particulier est représentée par une séquence choisie parmi SEQ ID NO : 31, SEQ ID NO : 32, SEQ ID NO : 33, SEQ ID NO : 34 et SEQ ID NO : 35, pour préparer une composition destinée à moduler l'activité de la SASPase.

Les compositions pharmaceutiques ou cosmétiques revendiquées et considérées selon l'invention peuvent être des compositions utilisées dans les domaines cosmétique, dermatologique, dermato-cosmétique et pharmacologique.

Un milieu physiologiquement acceptable est selon l'invention un milieu cosmétiquement ou pharmaceutiquement acceptable compatible avec la peau, les muqueuses, les ongles et/ou les cheveux.

Les compositions selon l'invention peuvent être appliquées sur les ongles, les cheveux et plus particulièrement sur la peau et les muqueuses.

Elles sont particulièrement avantageuses pour agir sur un ou plusieurs mécanismes épidermiques tels que la dégradation de protéine(s), l'activation d'enzyme(s), et/ou la régulation du phénomène de différenciation/prolifération épidermique.

En l'occurrence, les compositions selon l'invention sont particulièrement utiles pour suppléer à un déséquilibre de la différenciation/prolifération épidermique. Plus particulièrement, elles peuvent être utiles pour réguler les phénomènes d'hydratation, d'inflammation, de mélanogénèse, et/ou de desquamation, le phénomène de vieillissement, les mécanismes de défense, pour la régulation de la différenciation/prolifération sur certains types cellulaires et cutanés : kératinocytes, mélanocytes, cellules de Langerhans, sébocytes, adipocytes, ainsi que la régulation des phénomènes de sécrétion et de processus d'invasion.

D'une manière plus précise, les compositions revendiquées s'avèrent intéressantes dans les domaines suivants :

- pour traiter les affections dermatologiques liées à un désordre de la kératinisation portant sur la différenciation et sur la prolifération notamment pour traiter les acnés vulgaires, comédoniennes, polymorphes, rosacées, les acnés nodulokystiques, conglobata, les acnés séniles, les acnés secondaires telles que l'acné solaire,5 médicamenteuse ou professionnelle,
- pour traiter d'autres types de troubles de la kératinisation, notamment les ichtyoses, les états ichtyosiformes, la maladie de Darrier, les dératodermies palmoplantaires, les leucoplasies et les états leucoplasiformes, le lichen cutané ou muqueux (buccal),
- 10 - pour traiter d'autres affections dermatologiques liées à un trouble de la kératinisation avec une composante inflammatoire et/ou immuno-allergique et notamment toutes les formes de psoriasis qu'il soit cutané, muqueux ou unguéal, et même le rhumatisme psoriatique, ou encore l'atopie cutanée telle que l'eczéma, ou l'urticaire ou encore l'hypertrophie gingivale; les composés peuvent également être utilisés dans
- 15 certaines affections inflammatoires ne présentant pas de trouble de la kératinisation,
- pour traiter toutes les proliférations dermiques ou épidermiques qu'elles soient bénignes ou malignes, qu'elles soient ou non d'origine virale telles que verrues vulgaires, les verrues planes et l'épidermodysplasie verruciforme, les papillomatoses orales ou florides et les proliférations pouvant être induites par les ultra-
- 20 violets notamment dans le cas des épithélioma baso- et spino-cellulaires,
- pour traiter d'autres désordres dermatologiques tels que les dermatoses bulleuses et les maladies du collagène,
- pour réparer ou lutter contre le vieillissement de la peau, qu'il soit photoinduit ou chronologique ou pour réduire les pigmentations et les kératoses actiniques,
- 25 ou toutes pathologies associées au vieillissement chronologique ou actinique,
- pour prévenir ou guérir les stigmates de l'atrophie épidermique et/ou dermique induite par les corticostéroïdes locaux ou systématiques, ou toute autre forme d'atrophie cutanée,
- pour prévenir ou traiter les troubles de la cicatrisation ou pour
- 30 prévenir ou pour réparer les vergetures, et
- pour lutter contre les troubles de la fonction sébacée tels que l'hyperséborrhée de l'acné ou la séborrhée simple.

Dans le cas d'une application dans le domaine cosmétique, en particulier pour l'hygiène corporelle et capillaire, les compositions selon l'invention sont notamment utiles pour le traitement des peaux à tendance acnéique, pour la repousse des cheveux, l'anti-chute, pour lutter contre l'aspect gras de la peau ou des cheveux, dans la protection contre les aspects néfastes du soleil ou dans le traitement des peaux physiologiquement sèches, pour prévenir et/ou pour lutter contre le vieillissement photoinduit ou chronologique. Elles peuvent également être utiles pour améliorer les peaux reconstruites. On peut également utiliser directement dans le milieu de culture le polypeptide et/ou ses dérivés et/ou des modulateurs de son activité ou de son activation.

Un autre objet de l'invention est un procédé de traitement cosmétique destiné à lutter contre les troubles cutanés liés à un dysfonctionnement de la prolifération et/ou de la différenciation cellulaire comme notamment les peaux sèches, l'hyperkératose, la parakératose, les troubles de sébogénèse, les néoplasies et/ou les signes de vieillissement cutané caractérisé en ce que l'on applique sur la peau, les muqueuses et/ou les fibres kératiniques une composition cosmétique comprenant au moins un polypeptide dont la séquence peptidique comprend au moins une séquence choisie parmi SEQ ID NO : 1, SEQ ID NO : 4, SEQ ID NO : 5, SEQ ID NO : 6, SEQ ID NO : 7, SEQ ID NO : 8, SEQ ID NO : 9, SEQ ID NO : 16, SEQ ID NO : 25 et SEQ ID NO : 27 et en particulier qui est représentée en tout ou partie par SEQ ID NO : 5, SEQ ID NO : 6, SEQ ID NO : 7, SEQ ID NO : 16, SEQ ID NO : 25 ou SEQ ID NO : 27, et plus particulièrement qui possède la séquence SEQ ID NO : 5, SEQ ID NO : 6, SEQ ID NO : 7, SEQ ID NO : 16, SEQ ID NO : 25 ou SEQ ID NO : 27 ou d'un mélange issu de la protéolyse de l'un de ces polypeptides.

Le procédé de traitement de l'invention est un procédé cosmétique destiné à améliorer l'aspect esthétique de l'individu subissant des troubles de la prolifération et/ou de la différenciation épidermique.

L'invention concerne également l'utilisation d'un polypeptide dont la séquence peptidique comprend au moins une séquence choisie parmi SEQ ID NO : 1, SEQ ID NO : 4, SEQ ID NO : 5, SEQ ID NO : 6, SEQ ID NO : 7, SEQ ID NO : 8, SEQ ID NO : 9, SEQ ID NO : 16, SEQ ID NO : 25 et SEQ ID NO : 27 et notamment qui est représentée en tout ou partie par SEQ ID NO : 5, SEQ ID NO : 6, SEQ ID NO : 7, SEQ ID NO : 16, SEQ ID NO : 25 ou SEQ ID NO : 27, et plus particulièrement qui

possède la séquence SEQ ID NO : 5, SEQ ID NO : 6, SEQ ID NO : 7, SEQ ID NO : 16, SEQ ID NO : 25 ou SEQ ID NO : 27 ou d'un mélange issu de la protéolyse de l'un de ces polypeptides pour la préparation d'une composition pharmaceutique destinée au traitement des affections dermatologiques et notamment celles citées précédemment.

5 En particulier, l'invention concerne l'utilisation d'un polypeptide ou d'un mélange tel que décrit précédemment pour la préparation d'une composition pharmaceutique destinée à traiter l'ichtyose, le psoriasis ou toute pathologie impliquant une hyperkératose, une parakératose ou ayant une composante inflammatoire. Il peut également s'agir de compositions anti-douleur, de compositions pour traiter certaines
10 maladies de la peau comme l'eczéma, la rosacée, le psoriasis, les lichens, les prurits sévères.

Dans la mesure où les polypeptides de séquence SEQ ID NO : 5, SEQ ID NO : 6, SEQ ID NO : 16, SEQ ID NO : 25 ou SEQ ID NO : 27 possèdent des homologues de structure importantes avec les protéines rétrovirales, comme il est montré
15 dans les exemples et en figure 4, et notamment avec celles du virus de l'immunodéficience humaine, ils sont également susceptibles de se comporter comme des agents capables de moduler l'infection virale ou d'être modulés par certaines antiprotéases virales.

En conséquence, la présente invention a également pour objet l'utilisation d'un polypeptide dont la séquence peptidique comprend au moins une séquence choisie parmi
20 SEQ ID NO : 1, SEQ ID NO : 4, SEQ ID NO : 5, SEQ ID NO : 6, SEQ ID NO : 7, SEQ ID NO : 8, SEQ ID NO : 9, SEQ ID NO : 16, SEQ ID NO : 25 et SEQ ID NO : 27, et leurs homologues, notamment est représentée en tout ou partie par SEQ ID NO : 5, SEQ ID NO : 6, SEQ ID NO : 7, SEQ ID NO : 16, SEQ ID NO : 25 et SEQ ID NO : 27 et plus particulièrement qui possède la séquence SEQ ID NO : 5, SEQ ID NO : 6,
25 SEQ ID NO : 7, SEQ ID NO : 16, SEQ ID NO : 25 et SEQ ID NO : 27 pour la préparation d'une composition antivirale.

Ces compositions peuvent notamment être utiles pour traiter des pathologies épidermiques, associées à un virus de type papillomavirus, HERPES ou HIV.

De même, de telles compositions peuvent être avantageuses pour traiter les
30 effets secondaires liés à une inhibition de la SASPase endogène par les médicaments dirigés contre ces virus ou autres virus pathologiques. Plus particulièrement, cette application spécifique des polypeptides selon l'invention, met à profit l'homologie de

structure constatée entre la SASPase et les rétropepsines virales, comme illustrée par les exemples ci-après.

Le traitement implique généralement une application sur la peau du sujet à traiter de la composition telle que décrite précédemment.

5 La présente invention a également pour objet l'utilisation d'un polypeptide dont la séquence peptidique est choisie parmi les séquences SEQ ID NO : 1, SEQ ID NO : 4, SEQ ID NO : 5, SEQ ID NO : 6, SEQ ID NO : 7, SEQ ID NO : 8, SEQ ID NO : 9, SEQ ID NO : 16 et SEQ ID NO : 25 ou SEQ ID NO : 27 à titre d'outil dans une méthode de diagnostic ou de criblage ou pour la préparation d'un outil de diagnostic.

10 Plus précisément, l'invention vise l'utilisation d'un polypeptide dont la séquence peptidique est choisie parmi SEQ ID NO : 1, SEQ ID NO : 4, SEQ ID NO : 5, SEQ ID NO : 6, SEQ ID NO : 7, SEQ ID NO : 8, SEQ ID NO : 9, SEQ ID NO : 16, SEQ ID NO : 25 et SEQ ID NO : 27 et leurs homologues, plus particulièrement d'un polypeptide qui possède la séquence SEQ ID NO : 5, SEQ ID NO : 6, SEQ ID NO : 7,
15 SEQ ID NO : 16, SEQ ID NO : 25 ou SEQ ID NO : 27 ou de ses fragments de protéolyse et de tout peptide synthétique déduit de sa séquence, pour préparer ou purifier, éventuellement à partir d'épiderme, toute molécule, susceptible de moduler son interaction avec d'éventuels ligands.

 En outre, l'invention vise l'utilisation d'un polypeptide dont la séquence
20 peptidique est choisie parmi SEQ ID NO : 1, SEQ ID NO : 4, SEQ ID NO : 5, SEQ ID NO : 6, SEQ ID NO : 7, SEQ ID NO : 8, SEQ ID NO : 9, SEQ ID NO : 16, SEQ ID NO : 25 et SEQ ID NO : 27 et leurs homologues, et plus particulièrement d'un polypeptide qui possède la séquence SEQ ID NO : 5, SEQ ID NO : 6, SEQ ID NO : 7, SEQ ID NO : 16, SEQ ID NO : 25 ou SEQ ID NO : 27, de ses fragments de protéolyse ou
25 de tout peptide synthétique déduit de sa séquence, pour sélectionner de nouvelles molécules antivirales présentant moins d'effets secondaires.

 L'invention a également pour objet l'utilisation d'un polypeptide dont la séquence peptidique est choisie parmi SEQ ID NO : 1, SEQ ID NO : 4, SEQ ID NO : 5, SEQ ID NO : 6, SEQ ID NO : 7, SEQ ID NO : 8, SEQ ID NO : 9, SEQ ID NO : 16,
30 SEQ ID NO : 25 et SEQ ID NO : 27 et leurs homologues, et plus particulièrement d'un polypeptide qui possède la séquence SEQ ID NO : 5, SEQ ID NO : 6, SEQ ID NO : 7, SEQ ID NO : 16, SEQ ID NO : 25 ou SEQ ID NO : 27, de ses fragments de protéolyse, ou

de tout peptide synthétique déduit de sa séquence, pour préparer des antisérums et/ou des anticorps monoclonaux spécifiques, visant notamment à purifier ledit polypeptide et ses fragments ou à moduler son activité.

5 Par extension, l'invention a également pour objet toute utilisation de ladite séquence pour produire des anticorps ou fragments d'anticorps recombinants, quel que soit le système biologique utilisé pour produire ces derniers.

L'invention a encore pour objet un anticorps poly- ou mono-clonal caractérisé par le fait qu'il reconnaît spécifiquement un polypeptide dont la séquence peptidique est représentée en tout ou partie par SEQ ID NO : 5, SEQ ID NO : 6, SEQ ID NO : 7,
10 SEQ ID NO : 16, SEQ ID NO : 25 ou SEQ ID NO : 27, et plus particulièrement qui est constituée par la séquence SEQ ID NO : 5, SEQ ID NO : 6, SEQ ID NO : 7, SEQ ID NO : 16, SEQ ID NO : 25 ou SEQ ID NO : 27.

L'invention vise également l'utilisation de cet anticorps pour la préparation d'une composition destinée au diagnostic d'une déficience ou d'une surexpression de la
15 protéine SASPase (SEQ ID NO : 5).

Elle concerne également l'utilisation d'un anticorps pour la préparation d'une composition visant à bloquer l'activité et/ou activer la SASPase dans le traitement de pathologies caractérisées par une surexpression et/ou une activité exagérée de la SASPase.

L'anticorps peut être un anticorps préparé par immunisation de toute espèce
20 animale utilisable à cette fin, particulièrement le lapin. L'anticorps peut être préparé par immunisation à l'aide d'un polypeptide de l'invention que celui-ci soit d'origine naturelle ou synthétique ou recombinante de préférence purifié.

On sait qu'une protéine est synthétisée dans les cellules à partir d'une matrice d'acide désoxyribonucléique (ADN) codant pour ladite protéine. On sait également que le
25 code génétique est dégénéré. Ainsi, la séquence d'acides aminés du polypeptide de l'invention peut être issue de différentes séquences d'acide désoxyribonucléique, naturelles ou synthétiques. Par séquence d'acide désoxyribonucléique synthétique, on entend ici toute séquence obtenue chimiquement ou par manipulation génétique.

Lesdites séquences d'acide désoxyribonucléique peuvent être issues de toutes
30 origines possibles à savoir soit animale, en particulier de mammifères et encore plus particulièrement humaine, soit végétale, soit de micro-organismes (virus, phages, bactéries entre autres) ou encore de champignons, sans préjuger du fait qu'elles soient présentes de

manière naturelle ou non dans ledit organisme d'origine.

En l'occurrence, l'invention se rapporte aux fragments d'acide désoxyribonucléique isolés et purifiés codant les polypeptides revendiqués.

5 Au cours de ces travaux, la demanderesse a pu isoler et purifier les fragments d'acide désoxyribonucléique codant les séquences primaires d'acides aminés des polypeptides de séquence SEQ ID NO : 5, SEQ ID NO : 6, SEQ ID NO : 7, SEQ ID NO : 16, SEQ ID NO : 25 ou SEQ ID NO : 27 à partir de peau humaine.

10 L'invention a pour objet un fragment d'acide désoxyribonucléique isolé et purifié dont la séquence nucléotidique comprend au moins la séquence nucléotidique codante SEQ ID NO : 24 et en particulier est représentée par la séquence nucléotidique codante SEQ ID NO : 19, SEQ ID NO : 20, SEQ ID NO : 24, SEQ ID NO : 26 ou SEQ ID NO : 28.

15 Les séquences d'acides nucléiques selon l'invention peuvent notamment être utilisées pour préparer des séquences d'acide ribonucléique correspondantes sens ou antisens.

L'invention a également pour objet tout polynucléotide, acide ribonucléique ou désoxyribonucléique, sens ou antisens, notamment « Small interferential RNA », correspondants au moins à la séquence nucléotidique codante SEQ ID NO : 19, SEQ ID NO : 20, SEQ ID NO : 24, SEQ ID NO : 26 ou SEQ ID NO : 28.

20 Les séquences d'acides nucléiques de l'invention peuvent également être utilisées pour réaliser des amorces oligonucléotidiques, qui s'hybrident dans des conditions de forte stringence à la séquence SEQ ID NO : 17, SEQ ID NO : 18, SEQ ID NO : 19, SEQ ID NO : 20, SEQ ID NO : 21, SEQ ID NO : 22, SEQ ID NO : 23, SEQ ID NO : 24, SEQ ID NO : 26 et SEQ ID NO : 28.

25 Ces amorces oligonucléotidiques sens et/ou antisens peuvent être utiles pour des réactions de séquençage ou d'amplification spécifique selon la technique dite de PCR (réaction de polymérisation en chaîne) ou toute autre variante de celle-ci dans le but de clonage, d'identification ou de diagnostic d'un polypeptide représenté par SEQ ID NO : 1, SEQ ID NO : 4, SEQ ID NO : 5, SEQ ID NO : 6, SEQ ID NO : 7, SEQ ID NO : 8, 30 SEQ ID NO : 9, SEQ ID NO : 16, SEQ ID NO : 25 ou SEQ ID NO : 27.

En particulier, les sondes ou amorces de l'invention sont marquées, préalablement à leur utilisation. Pour cela, plusieurs techniques sont à la portée de

l'homme du métier comme par exemple le marquage fluorescent, radioactif, chimioluminescent ou enzymatique.

Les méthodes de diagnostic in vitro dans lesquelles ces sondes nucléotidiques sont mises en œuvre pour la détection de synthèses de séquences nucléiques codant pour un polypeptide selon l'invention sont incluses dans la présente invention.

Le fragment d'ADN correspondant à la séquence SEQ ID NO : 19, SEQ ID NO : 20, SEQ ID NO : 24, SEQ ID NO : 26 ou SEQ ID NO : 28 peut également être introduit dans un vecteur d'expression permettant ainsi la synthèse d'une protéine dite recombinante correspondante.

L'invention a donc également pour objet un vecteur d'expression recombinant contenant tout ou partie de la séquence nucléotidique codante SEQ ID NO : 19, SEQ ID NO : 20, SEQ ID NO : 24, SEQ ID NO : 26 ou SEQ ID NO : 28.

L'invention a également pour objet une composition cosmétique ou pharmaceutique comprenant, dans un milieu physiologiquement acceptable une séquence d'acide désoxyribonucléique, naturelle ou synthétique, codant pour la séquence primaire d'acides aminés d'un polypeptide conforme à l'invention ou une séquence d'acide ribonucléique sens ou antisens, notamment antisens interférentiel, correspondants à ladite séquence SEQ ID NO : 19, SEQ ID NO : 20, SEQ ID NO : 24, SEQ ID NO : 26 ou SEQ ID NO : 28.

D'une manière générale, toute composition de l'invention peut être ingérée, injectée ou appliquée sur la peau (sur toute zone cutanée du corps) ou sur les muqueuses (buccale, jugale, gingivale, génitale, conjonctivale, ...).

De préférence, une composition de l'invention est appliquée sur la peau ou les muqueuses.

Selon le mode d'administration considéré, elle peut se présenter sous toutes les formes galéniques normalement utilisées.

Pour une application topique sur la peau, la composition peut avoir la forme notamment de solutions aqueuses ou huileuses ou de dispersions du type lotion ou sérum, d'émulsions de consistance liquide ou semi-liquide du type lait, obtenues par dispersion d'une phase grasse dans une phase aqueuse (H/E) ou inversement (E/H), ou de suspensions ou émulsions de consistance molle du type crème ou gel aqueux ou anhydres, ou encore de microcapsules ou microparticules, ou de dispersions vésiculaires de type ionique et/ou non

ionique ou de mousses. Ces compositions sont préparées selon les méthodes usuelles.

Pour l'injection, la composition peut se présenter sous forme de lotions aqueuses, huileuses ou sous forme de sérums. Pour les yeux, elle peut se présenter sous forme de gouttes et pour l'ingestion, elle peut se présenter sous forme de capsules, de
5 granulés, de sirops ou de comprimés.

Les quantités des différents constituants des compositions selon l'invention sont celles classiquement utilisées dans les domaines considérés.

Dans le domaine de la cosmétique, ces compositions constituent notamment des crèmes de nettoyage, de protection, de traitement ou de soin pour le visage, pour les
10 mains, pour les pieds, pour les grands plis anatomiques ou pour le corps (par exemple crèmes de jour, crèmes de nuit, crèmes de démaquillage, crèmes de fond de teint, crèmes anti-solaires), des fonds de teint fluides, des laits de démaquillage, des laits corporels de protection ou de soin, des laits anti-solaires, des lotions, gels ou mousses pour le soin de la
15 peau, comme des lotions de nettoyage, des lotions anti-solaires, des lotions de bronzage artificiel, des compositions pour le bain, des compositions désodorisantes comprenant un agent bactéricide, des gels ou lotions après-rasage, des crèmes épilatoires, des compositions contre les piquûres d'insectes, des compositions anti-douleur, des compositions pour traiter certaines maladies de la peau comme l'eczéma, la rosasée, le psoriasis, les lichens et les prurits sévères.

20 Les compositions selon l'invention peuvent également consister en des préparations solides constituant des savons ou des pains de nettoyage.

Les compositions peuvent aussi être conditionnées sous forme de composition pour aérosol comprenant également un agent propulseur sous pression.

Une composition selon l'invention peut aussi être une composition pour les
25 soins du cuir chevelu, et notamment un shampoing, une lotion de mise en plis, une lotion traitante, une crème ou un gel coiffant, une composition de teintures (notamment teintures d'oxydation) éventuellement sous forme de shampoings colorants, de lotions restructurantes pour les cheveux, une composition de permanente (notamment une composition pour le premier temps d'une permanente), une lotion ou un gel antichute, un
30 shampoing antiparasitaire, antipelliculaire etc.

Une composition peut aussi être à usage bucco-dentaire, par exemple une pâte dentifrice. Dans ce cas, la composition peut contenir des adjuvants et additifs usuels pour

les compositions à usage buccal et notamment des agents tensioactifs, des agents épaississants, des agents humectants, des agents de polissage tels que la silice, divers ingrédients actifs comme les fluorures, en particulier le fluorure de sodium, et éventuellement des agents édulcorants comme le saccharinate de sodium.

5 Lorsque la composition est une émulsion, la proportion de la phase grasse peut varier d'environ 5 % à 80 % en poids, et de préférence d'environ 5 % à 50 % en poids par rapport au poids total de la composition. Les huiles, les cires, les émulsionnants et les co-émulsionnants utilisés dans la composition sous forme d'émulsion sont choisis parmi ceux classiquement utilisés dans le domaine cosmétique. L'émulsionnant et le co-émulsionnant
10 sont présents, dans la composition, en une proportion allant de 0,3 % à 30 % en poids, et de préférence de 0,5 % à 20 % en poids par rapport au poids total de la composition. L'émulsion peut, en outre, contenir des vésicules lipidiques.

 Lorsque la composition est une solution ou un gel huileux, la phase grasse peut représenter plus de 90 % du poids total de la composition.

15 De façon connue, la composition cosmétique peut contenir également des adjuvants habituels dans le domaine cosmétique, tels que les gélifiants hydrophiles ou lipophiles, les additifs hydrophiles ou lipophiles, les conservateurs, les antioxydants, les solvants, les parfums, les charges, les filtres, les absorbeurs d'odeurs et les matières colorantes. Les quantités de ces différents adjuvants sont celles classiquement utilisées
20 dans le domaine cosmétique, et par exemple varient d'environ 0,01 % à 10 % du poids total de la composition. Ces adjuvants, selon leur nature, peuvent être introduits dans la phase grasse, dans la phase aqueuse et/ou dans les sphérules lipidiques.

 Comme huiles ou cires utilisables dans l'invention, on peut citer les huiles minérales (huile de vaseline), les huiles végétales (fraction liquide du beurre de karité,
25 huile de tournesol), les huiles animales (perhydrosqualène), les huiles de synthèse (huile de Purcellin), les huiles ou cires siliconées (cyclométhicone) et les huiles fluorées (perfluoropolyéthers), les cires d'abeille, de carnauba ou paraffine. On peut ajouter à ces huiles des alcools gras et des acides gras (acide stéarique). Comme émulsionnants utilisables dans l'invention, on peut citer par exemple le stéarate de glycérol, le polysorbate
30 60 et le mélange de PEG-6/PEG-32/Glycol Stéarate vendu sous la dénomination de Tefose[®] 63 par la société Gattefosse.

 Comme solvants utilisables dans l'invention, on peut citer les alcools inférieurs

notamment l'éthanol et l'isopropanol et le propylène glycol.

Comme gélifiants hydrophiles utilisables dans l'invention, on peut citer les polymères carboxyvinyliques (carbomer®), les copolymères acryliques tels que les copolymères d'acrylates/alkylacrylates, les polyacrylamides, les polysaccharides tels que l'hydroxypropylcellulose, les gommes naturelles et les argiles, et, comme gélifiants lipophiles, on peut citer les argiles modifiées comme les bentones, les sels métalliques d'acides gras comme les stéarates d'aluminium, la silice hydrophobe, l'éthylcellulose et le polyéthylène.

La composition peut contenir d'autres actifs hydrophiles comme les protéines ou les hydrolysats de protéines, les acides aminés, les polyols, l'urée, l'allantoïne, les sucres et les dérivés de sucre, les vitamines hydrosolubles, les extraits végétaux et les hydroxyacides.

Comme actifs lipophiles, on peut utiliser le rétinol (vitamine A) et ses dérivés, le tocophérol (vitamine E) et ses dérivés, les acides gras essentiels, les céramides, les huiles essentielles, l'acide salicylique et ses dérivés.

Selon l'invention la composition peut associer au moins un autre agent actif destiné notamment à la prévention et/ou au traitement des affections cutanées. Parmi ces agents actifs, on peut citer à titre d'exemple :

- les agents diminuant la différenciation et/ou la prolifération et/ou la pigmentation cutanée tels que l'acide rétinoïque et ses isomères, le rétinol et ses esters, la vitamine D et ses dérivés, les oestrogènes tels que l'oestradiol, l'acide kojique ou l'hydroquinone ;
- les antibactériens tels que le phosphate de clindamycine, l'érythromycine ou les antibiotiques de la classe des tétracyclines ;
- les antiparasitaires, en particulier le métronidazole, le crotamiton ou les pyréthriinoïdes ;
- les antifongiques, en particulier les composés appartenant à la classe des imidazoles tels que l'éconazole, kétoconazole ou le miconazole ou leurs sels, les composés polyènes, tels que l'amphotéricine B, les composés de la famille des allylamines, tels que la terbinafine, ou encore l'octopirox ;
- les agents antiviraux tels que l'acyclovir ;
- les agents anti-inflammatoires stéroïdiens, tels que l'hydrocortisone,

le valérate de bétaméthasone ou le propionate de clobétasol, ou les agents anti-inflammatoires non-stéroïdiens comme par exemple l'ibuprofène et ses sels, le diclofénac et ses sels, l'acide acétylsalicylique, l'acétaminophène ou l'acide glycyrrhizique ;

- 5 dérivés ;
 - les agents anesthésiques tels que le chlorhydrate de lidocaïne et ses
- les agents antiprurigineux comme la thénaldine, la triméprazine ou la cyproheptadine ;
- les agents kératolytiques tels que les acides α - et β -hydroxycarboxyliques ou β -cétocarboxyliques, leurs sels, amides ou esters et plus
- 10 particulièrement les hydroxyacides tels que l'acide glycolique, l'acide lactique, l'acide salicylique, l'acide citrique et de manière générale les acides de fruits, et l'acide n-octanoyl-5-salicylique ;
- les agents anti-radicaux libres, tels que l' α -tocophérol ou ses esters, les superoxydes dismutases, certains chélatants de métaux ou l'acide ascorbique et ses
- 15 esters ;
- les antiséborrhéiques tels que la progestérone ;
- les antipelliculaires comme l'octopirox ou la pyrithione de zinc ;
- les antiacnéiques comme l'acide rétinoïque ou le peroxyde de benzoyle.

20 Ainsi, selon le mode particulier, la composition selon l'invention comprend également au moins un agent choisi parmi les agents antibactériens, antiparasitaires, antifongiques, antiviraux, anti-inflammatoires, antiprurigineux, anesthésiques, kératolytiques, anti-radicaux libres, anti-séborrhéiques, antipelliculaires, antiacnéiques et/ou les agents diminuant la différenciation et/ou la prolifération et/ou la pigmentation

25 cutanée.

Les exemples figurant ci-après sont présentés à titre illustratif et non limitatif de l'invention.

FIGURES

- 30 - Figure 1 : Photographie du gel d'électrophorèse 2D obtenu selon l'exemple I,
- Figure 2 : Représentation de l'influence du pH sur l'activité protéolytique

de la SASPase,

- Figure 3 : Analyse de l'activité d'un certain nombre de modulateurs conventionnels vis-à-vis de l'activité protéolytique de la SASPase,

- Figure 4 : Représentation des homologies de structure entre la SASPase et des protéases,

- Figure 5 : Représentation de l'hydrolyse des substrats représentés par les séquences SEQ ID NO : 31, SEQ ID NO : 32, SEQ ID NO : 33, SEQ ID NO : 34 et SEQ ID NO : 35 par la SASPase.

EXEMPLES

Matériels

Les oligonucléotides utilisés dans les différentes expériences sont présentés ci-après dans le tableau I.

TABLEAU I

Nom de l'amorce	Séquence 5' à 3'	SEQ ID N°
SC 130	GATAGGATCCATGGCCGGGAGCGGAGCCAGGAG	12
SC 131	TTGAATTCTCAGTGGGATAGCTCCTGCCGC	11
SC 134	GGCCCTGGGTGTCTACAATA	13
SC 135	TTGGCCACCTTTACCACATT	14
SC 140	TAGGATCCATGGGGAGCCCAGGGGC	10
Not I-(dT) ₁₈ est un oligonucléotide vendu par la société Amersham Pharmacia Biotech		

Not I-(dT)₁₈ est conçu pour se fixer aux longues séries de A, par exemple les poly A +. Utilisé dans les réactions de transcription inverse, Not I-(dT)₁₈ se fixe au poly A +.

EXEMPLE I – Identification et isolement de la SASPase par électrophorèse bidimensionnelle sur gel et séquençage

a) Préparation à partir d'épiderme humain

Tampons :

I : SDS 0,3 % ; tris-HCl 28 mM ; tris-base 22 mM

2D : 8M urée ; 2 % (p/v) 3-[(3-cholamidopropyl)diméthylammonio]-1-propane-sulfonate (CHAPS) ; Dithiothréitol 20 mM ; tampon 0,5 % (v/v) Imobiline pH gradient (IPG) pH = 3 9-10 de 18 cm commercialisé par la société Amersham Pharmacia Biotech.

5 Des extraits d'épiderme reconstruit humain sont préparés à partir de 30 nacelles du kit Episkin J13. 15 ml de tampon I sont ajoutés aux 30 épidermes reconstruits et le tout est pottérisé, porté à ébullition pendant 10 mn puis repottérisé. La solution est alors centrifugée à 10.000 g pendant 10 mn. Le surnageant est recueilli et filtré sur membrane 0,22 µm. On obtient ainsi 12 ml de surnageant SI. On ajoute alors au
10 surnageant SI, de l'acétone froide (10 v/2v). Après 20 mn d'incubation, on centrifuge le mélange obtenu à 9.400 g pendant 10 mn. Le surnageant est alors éliminé et le culot est séché à température ambiante pendant 20 mn. Le culot est alors repris dans 2 ml de tampon 2D. On obtient ainsi l'extrait EI. La concentration en protéine finale est de 11 mg/ml.

b) Gel bidimensionnel

15 La séparation en deux dimensions des protéines contenues dans l'extrait EI est réalisée sur un appareil de marque Pharmacia (modèle Multiphor II). La séparation en deux dimensions des protéines a été réalisée selon les recommandations du fournisseur hormis le fait que pour la rééquilibration du gel IPG après migration dans la première direction, l'iodoacétamide a été omis. La coloration des spots, la récupération de ceux-ci et le
20 séquençage des polypeptides qu'ils contenaient ont été réalisés selon les techniques décrites dans Méhul B, Bernard D, Simonetti L, Bernard MA, Schmidt R : Identification and cloning of a new calmodulin-like protein from human epidermis. J Biol Chem 275 : 12841-12347, 2000, ou encore « A practical guide to protein and peptide purification for microsequencing » (Paul Matsudaira éditeur, seconde édition 1993). En figure 1 est
25 représenté le gel d'électrophorèse correspondant.

Les protéines ont été détectées par une coloration à l'amide black. Les spots correspondant à des protéines identifiées par séquençage d'Edman sont localisés avec le nom de ces protéines. Le spot nommé SASPase permet de localiser une forme épidermique de la protéine ayant un PM apparent de 12 kD et un pI de 5,8.

30 Les résultats obtenus ont permis de caractériser les séquences SEQ ID NO : 1, SEQ ID NO : 2 et SEQ ID NO : 3.

EXEMPLE II - Isolement de l'ADNc codant la SASPase à partir de kératinocyte humain et expression de la SASPase (SEQ ID NO : 5) et de sa forme tronquée (Δ 1-84) (SEQ ID NO : 4)

a) Préparation de L'ADNc

5 Les ARN totaux de kératinocytes provenant d'épiderme humain reconstruit après 13 jours de culture ont été préparés à l'aide du kit de préparation d'ARN « RNeasy Kit® » et purifiés à l'aide du kit « QIAshredder column® », commercialisé par la société QIAGEN selon les instructions du fournisseur.

10 Les ADN complémentaires (ADNc) des ARN ainsi préparés ont été synthétisés à l'aide du kit « First Strand cDNA Synthesis® » commercialisé par la société Amersham Pharmacia Biotech selon les instructions du fournisseur en utilisant comme amorce, l'oligonucléotide Not I-(dT)₁₈.

15 Des fragments d'ADNc codant pour la SASPase complète ainsi obtenus ont été amplifiés par des réactions de polymérisation en chaîne (PCR) dans un appareil à cycles thermiques « Thermocycler® » commercialisé par la société Perkin-Elmer en utilisant une ADN polymérase pfu commercialisée par la société Promega et comme amorces, le couple d'oligonucléotides SC140 (SEQ ID NO : 10)/SC131 (SEQ ID NO : 11) et les conditions suivantes : 1 cycle (95°C pendant 2 mn.), 35 cycles (94°C pendant 30 sec., 65°C pendant 30 sec., 72°C pendant 2 mn.) et 1 cycle (72°C pendant 7 mn.).

20 De façon similaire, des fragments d'ADNc codant pour la forme tronquée de la SASPase (SEQ ID NO : 4), dépourvue des 84 résidus d'acides aminés N-terminaux de la SASPase dite Δ 1-84 ont été amplifiés par PCR en utilisant comme amorces, le couple d'oligonucléotides SC131/SC130 (SEQ ID NO : 11 et SEQ ID NO : 12).

b) Construction et expression de la SASPase recombinante (rSASPase)

25 L'ADNc de la SASPase obtenu précédemment est introduit dans le vecteur plasmidique pGex-4T-3 commercialisé par la société Amersham Pharmacia Biotech, par coupure/ligature aux sites de restriction BamH-1/EcoR1. Ce plasmide recombinant qui contient en phase dans le cadre de lecture, la séquence codante de la SASPase (SEQ ID NO : 5) et la séquence codante de la glutathion S-transférase (GST) est alors
30 introduit dans *E. coli* souche BL21 (DE3) commercialisé par la société Amersham Pharmacia Biotech. La protéine de fusion recombinante exprimée par les bactéries peut être coupée par la thrombine dans des conditions douces, la construction étant telle que la

protéine de fusion obtenue porte un site de coupure par cette protéase.

Le produit d'expression est purifié par chromatographie d'affinité sur colonne glutathion-sépharose.

5 L'ensemble de ces expériences a été réalisé en appliquant strictement les différents protocoles des fournisseurs.

L'analyse par électrophorèse sur gel SDS-PAGE d'une fraction aliquote du produit d'expression obtenu par mise en oeuvre de la méthode décrite précédemment montre que cette méthode permet l'obtention en quantité satisfaisante de la protéine de fusion recombinante GST-SASPase.

10 De façon similaire, on a obtenu l'expression en quantité satisfaisante de la protéine de fusion recombinante GST-SASPase tronquée Δ 1-84 (SEQ ID NO : 4).

EXEMPLE III - Obtention de la SASPase activée (SEQ ID NO : 6)

15 La protéine de fusion recombinante GST-SASPase Δ 1-84 (SEQ ID NO : 4) élue de la colonne glutathion sépharose obtenue à l'exemple II, est incubée avec de la thrombine dans du tampon PBS, à pH8 pendant 18 heures à 22°C. Le tampon est échangé par filtration sur gel G25[®] Biorad contre une solution 100 mM acétate, pH 4,5. Le mélange ainsi obtenu est soumis à une chromatographie cationique en utilisant un gradient de NaCl
20 (0 à 1 M NaCl). Les fractions contenant la GST et la thrombine sont éliminées et la fraction élue par la solution à 750 mM de NaCl est récupérée. Une analyse par électrophorèse sur gel SDS-PAGE effectuée sur la fraction élue par la solution de NaCl à 750 mM, contenant une activité caséinolytique (donnée non présentée) montre la présence
25 présente une masse moléculaire apparente de 12kD et une bande minoritaire qui correspond à la forme tronquée SASPase Δ 1-84 (SEQ ID NO : 4).

La forme de 12kD correspond à la forme activée de la SASPase. Le séquençage d'Edman indique que le produit isolé correspond à la SASPase activée (SEQ ID NO : 6).

30

EXEMPLE IV – Obtention de la SASPase activée (SEQ ID NO : 25)

La délétion du site codant pour la séquence FANS sur la forme tronquée de la

SASPase (SEQ ID NO : 4) à l'aide du kit Quick Change Site-directed Mutagenesis (Stratagene) et des primers adaptés est effectuée en utilisant comme matrice d'ADN la construction plasmidique de la séquence de la SASPase C27 (SEQ ID NO : 4) dans le vecteur pGEX-4T3.

5 Une protéine dont la séquence protéique est représentée par SEQ ID NO : 36 est obtenue.

Après incubation à pH 5,00 dans du tampon acétate de cette nouvelle protéine il y a, de façon surprenante, génération d'un fragment de bas poids moléculaire (environ 21 kDa en électrophorèse SDS-PAGE) qui possède au plus la séquence SEQ ID NO : 25 de
10 masse théorique 18731.44.

La SEQ ID NO : 27 de masse théorique 16794.43 est obtenue à partir de la SEQ ID NO : 25 en assumant une activation en C-terminal identique à la forme SEQ ID NO : 6.

15 **EXEMPLE V – Caractérisation de l'activité protéolytique de la protéine SASPase**

a) Activité vis-à-vis d'un substrat

Cette activité a été démontrée selon le protocole suivant :

L'insuline chaîne Beta oxydée (Sigma) est utilisée comme substrat. La
20 concentration est de 50µg dans 1,5 ml de tampon acétate 0,1M pH 5,0. On ajoute 50 µl de SASPase 12 kD purifiée (SEQ ID NO : 6) (environ 1mg/ml) par gel filtration pour initialiser l'hydrolyse. Des témoins sans enzyme ou sans substrat sont utilisés comme contrôles. Au cours du temps (1h à 24h à 37° C) des HPLC sont effectuées pour suivre l'hydrolyse. Les pics apparaissant rapidement correspondent aux sites d'hydrolyse
25 principaux et ceux n'apparaissant qu'au bout de 24h aux sites secondaires. Les pics sont collectés après leur fractionnement et séquencés en N-terminal (séquençage d'EDMAN, Institut Pasteur).

FVNQHLCGSHLVEALYLVCGERGFF (SEQ ID NO : 15).

Site principal : E/A (de type pepsin-like)

30 Sites secondaires : L/Y et Y/L (de type pepsin-like)

Ces résultats montrent que la SASPase activée est capable de dégrader l'insuline. La dénaturation thermique (95° C – 10 mn) de la SASPase abolit son activité de

dégradation de l'insuline. Son activité caséinolytique a par ailleurs été démontrée (résultats non présentés).

b) Activité autocatalytique

Dans ce second essai, c'est la protéine GST-SASPase (SEQ ID NO : 4) qui est elle-même utilisée comme substrat par autocatalyse.

La GST-SASPase à 3mg/ml dans du tampon phosphate 0,1M pH 7,0 50 % glycérol est acidifiée rapidement à pH 5,0 par du tampon acétate 1M pH 4,5. A chaque temps d'incubation à 37° C un aliquot est pris et la réaction est bloquée par l'ajout d'un équivalent volume de tampon Laemmli sans DTT. A la fin de la cinétique chaque échantillon est analysé par électrophorèse SDS-PAGE (Gel à 15 % d'acrylamide) démontrant une apparition progressive d'une bande majoritaire migrant à un PM apparent de 12 kD consécutive à la disparition de la protéine de fusion.

Cet essai montre que l'on peut également obtenir directement la SASPase activée (SEQ ID NO : 6) par acidification à pH 3 à 6, de préférence 4 à 6 de la protéine de fusion recombinante GST-rSASPase Δ 1-84 ou GST-SASPase obtenues à l'exemple I suivi par une étape de purification par filtration sur gel (G75).

Par ailleurs, l'analyse des solutions activées par séquençage Edman et par spectromètre de masse de type QTOF fournit pour la protéase autoactivée trois sites de clivage à peu près équivalents en probabilités :

F/A (comme certaines cutané métalloprotéases)

N/S (site de coupure non répertorié)

E/L (uniquement décrit pour la matrilysine qui est capable d'activer l'urokinase et les MMP 1, 2 et 9).

EXEMPLE VI – Mutations dirigées sur le site actif de la SASPase prouvant son appartenance à la famille des protéases à acide aspartique.

Le kit Quick Change Site-directed Mutagenesis (Stratagene) est utilisé pour la réalisation des mutants de la SASPase.

La séquence de la SASPase SEQ ID NO : 5 est modifiée au niveau de l'acide aspartique n° 212, soit son site actif potentiel. Pour ce faire, deux oligonucléotides sont synthétisés de telle sorte que l'acide aminé 212 soit substitué soit en alanine (mutant A/D), soit en acide glutamique (mutant E/D).

Une amplification par PCR est réalisée avec chaque couple d'oligonucléotides mutés, la construction plasmidique de la séquence de la SASPase C27 dans le vecteur pGEX-4T3 est utilisée comme matrice d'ADN.

Des bactéries compétentes (XL1 blue) sont ensuite transformées avec chaque produit de PCR. Plusieurs clones sont amplifiés et séquencés afin de vérifier la présence de la mutation souhaitée et seulement de celle-ci.

Autoclivage de la SASPase C27 et de ses mutants :

Une production des protéines recombinantes mutées est réalisée selon le même protocole que pour la forme sauvage, SASPase C27; (SEQ ID NO : 4).

Chaque protéine recombinante produite sous forme de protéine de fusion est ensuite incubée dans un tampon acétate 1M, pH 4:5 à 37 °C. Des prélèvements au cours du temps sont réalisés et analysés par SDS-PAGE.

On observe une diminution au cours du temps de la forme entière GST-SASPase C27, ce qui démontre un autoclivage et par conséquent une autoactivation ; de nombreuses bandes de poids moléculaires inférieurs apparaissent. Les formes mutées (A/D) et (E/D), quant à elles, ne s'autoactivent pas.

Cette expérience confirme l'implication de l'acide aspartique n° 212 dans le site actif de la SASPase.

EXEMPLE VII - Analyse de l'expression de la SASPase par Northern Blot, RT-PCR dans des tissus humains et dans des kératinocytes.

Les analyses ont été effectuées par Northern Blot, en utilisant des membranes commerciales polyA + ARN blot (Ambion®) selon le protocole décrit par le fabricant, et par RT-PCR en utilisant une collection d'ADNc des membranes « rapid-scan® » humaines commercialisées par la société OriGene Technologies, Inc.

L'analyse par Northern Blot a été effectuée en utilisant comme sonde l'ADNc codant la forme (tronquée Δ 1-84) de la SASPase (SEQ ID NO : 4) isolée à partir du plasmide recombinant préparé à l'exemple II et à l'aide d'une membrane contenant différents échantillons d'ARN.

La PCR est effectuée en utilisant la Taq polymérase commercialisée par la société Promega, comme amorces, le couple d'oligonucléotides SC134 (SEQ ID NO : 13)/SC135 (SEQ ID NO : 14) dans les conditions suivantes :

- 1 cycle de 3 mn. à 94°C,
- 25 à 30 cycles (94°C pendant 30 sec., 53°C pendant 30 sec., 72°C pendant 60 sec.), et
- 1 cycle à 72°C pendant 5 mn.

5 Les produits de PCR résultants sont visualisés par coloration au bromure d'éthidium après séparation sur gel d'agarose 2 % (poids/volume).

Des résultats, il ressort que la SASPase est sensiblement exprimée dans la quasi-totalité des tissus testés à un niveau faible dans les foie foetal, cerveau foetal, ovaire, glande surrénale, thyroïde, placenta, testicules, estomac, muscle, poumon, foie, rate et
10 cœur, et encore plus faible dans la moelle osseuse, le pancréas, la salive, et l'intestin grêle. Cette expression est en revanche significative dans le cerveau et particulièrement très élevée dans la peau.

15 **EXEMPLE VIII - Oligomérisation de la SASPase utilisant un réactif de réticulation**

Le protocole utilisé s'inspire de la technique décrite dans T.D. Meek *et al.* ; Proc. Natl. Acad. Sci. USA vol. 86, pages 1841-1845, March 1989.

Une étude de la réticulation utilisant du BS3 (Pierce) est effectuée sur de la SASPase activée (SEQ ID NO : 6), obtenue par acidification et purification par
20 chromatographie d'exclusion (gel filtration) de la protéine de fusion recombinante GST-SASPase Δ 1-84.

A la SASPase activée (SEQ ID NO : 6) obtenue à l'exemple III, placée dans de la glace, on ajoute 1 μ g de BS3 dans 60 μ l de tampon phosphate 50 mM, pH 7, contenant 150 mM NaCl, 0,1 % TX100, 5 mM EDTA. On prépare également un échantillon témoin
25 exempt de BS3. Après 90 mn, on introduit dans les milieux réactionnels 2 μ l de Tris-HCl 1 M, pH 8, pour stopper la réaction. On analyse ensuite les produits obtenus par gel filtration sur gel, et par électrophorèse SDS-PAGE.

La SASPase activée incubée avec du BS3 forme un complexe multimérique stable qui par gel filtration sur gel, se sépare en trois pics majeurs. Trois bandes distinctes
30 sont également observables sur gel après électrophorèse SDS-PAGE dont les masses moléculaires apparentes, déterminées par comparaison avec les marqueurs des masses moléculaires sont respectivement de 12kD, comprises entre 10-14kD, 30-45kD et

60-100kD.

EXEMPLE IX - Influence du pH sur l'activité protéolytique de SASPase

10 µl de protéines de fusion GST-SASPase Δ 1-84 (environ 3 mg/ml) obtenus à l'exemple II sont incubés dans 200 µl de tampon acétate 0,1 M, ajusté à différents pH en présence du substrat caséine commercialisé sous la dénomination de Enzchek[®] par la société Molecular Probes et utilisé aux concentrations préconisées par le fournisseur.

Trois répétitions sont effectuées pour chaque essai.

Après 20 heures d'incubation à 37°C, la fluorescence est mesurée sur un lecteur de plaque commercialisé sous la dénomination de Biolumin[®] par la société Molecular Probes en utilisant le couple excitation/émission : 485/535 nm. Les résultats sont présentés en figure 2.

Ces résultats montrent que dans les conditions expérimentales retenues, l'activité enzymatique de la SASPase est dépendante du pH et présente un optimum à pH 5. Par ailleurs, des essais non présentés en tampon phosphate 0,1 M de pH 6 à 7,5 ne montrent qu'une faible activité résiduelle.

L'influence du pH sur l'auto-activation est également réalisée et montre une optimisation pour des pH entre 3 et 6,9 et de préférence entre 4 et 6.

EXEMPLE X - Etude de l'effet de différents inhibiteurs de la famille des protéases à acide aspartique sur l'activité caséinolytique de la SASPase activée (SEQ ID NO : 6)

10 µl de SASPase activée (SEQ ID NO : 6) auto-activés (environ 3 mg/ml), sont ajoutés dans 200 µl de tampon acétate 0,1 M, pH 5,5, contenant 20 µl de DMSO avec des inhibiteurs de rétropepsines. Un essai témoin est effectué dans les mêmes conditions en absence d'inhibiteur.

On pré-incube le mélange pendant 1 heure à 4°C, puis on ajoute le substrat, de la caséine commercialisée sous la dénomination Enzchek[®] par la société Molecular Probes en quantité suffisante pour obtenir la concentration préconisée par le fournisseur, les solutions ayant été préalablement réchauffées à 37°C.

Le suivi de l'hydrolyse de la caséine est effectué par mesure de la fluorescence sur un lecteur de plaques Biolumin[®] commercialisé par la société Molecular Probes en

utilisant le couple excitation/émission : 485/535 nm.

Les résultats obtenus sont présentés en figure 3. On constate que les cinétiques d'hydrolyse de la caséine, en présence des inhibiteurs de rétropepsines RP1 et RP2 sont plus faibles que le témoin. L'activité de la SASPase est donc inhibée par ces inhibiteurs.

- 5 - RP1 correspond à la séquence Ac-Leu-Val-Phe-aldéhyde et est commercialisé par Bachem sous la référence N 1395.0005,
- RP2 correspond à la séquence Ac-Leu-Leu-Met-aldéhyde et est commercialisé par Bachem sous la référence N 1315.0005 et
- 10 - RP3 correspond à la séquence Ac-Leu-Leu-Nle-aldéhyde et est commercialisé par Bachem sous la référence N 1320.0005.

On constate en outre que la cinétique d'hydrolyse de la caséine, en présence de l'inhibiteur de rétropepsine RP3, est significativement plus élevée que celle obtenue dans les conditions témoins. L'activité de la SASPase semble donc être stimulée par cet inhibiteur.

15

EXEMPLE XI - Etude de l'effet de la SASPase activée (SEQ ID NO : 6) sur la dégradation de la cornéodesmosine extraite de stratum corneum humain.

a) Principe

La cornéodesmosine est un marqueur de la desquamation car elle intervient
20 dans la cohésion cornéocytaire au niveau des cornéodesmosomes. Plus la protéine est dégradée, plus le détachement des cornéocytes est significatif. La dégradation de la cornéodesmosine est donc une étape clé de la desquamation.

Le test utilisé dans cette étude consiste donc à suivre cette dégradation en présence de la substance à tester.

25

b) Préparation de l'échantillon

Des poudres acétoniques sont préparées à partir de stripping vernis (Méhul B, Bernard D, Simonetti L, Bernard MA, Schmidt R : Identification and cloning of a new calmodulin-like protein from human epidermis. J Biol Chem 275 : 12841-12347, 2000) prélevés sur des bas de jambes de personnes volontaires à peau sèche. Des fractions
30 aliquotes de 2 mg de poudre de *stratum corneum* sont introduites séparément dans des tubes Eppendorfs, puis immergées dans les solutions à tester à raison de 100 µl/mg. Les solutions sont préparées en tampon acétate pH 5. Un témoin sans protéase est préparé en

parallèle afin d'évaluer la dégradation naturelle de la cornéodesmosine. Pour chaque test, on prépare trois échantillons. Les échantillons, essais et témoin sont incubés à 30°C sous agitation pendant 24 heures.

c) Extraction, séparation et détection des protéines.

5 Les protéines sont extraites avec du tampon Laemmli complet. Elles sont dosées par la méthode de Bradford (kit Bio-Rad®). La concentration de chaque échantillon est ajustée pour permettre la comparaison des échantillons. Les polypeptides sont séparés par électrophorèse SDS-PAGE sur gel d'acrylamide 15 %, puis transférés sur membrane de PVDF. Une immuno-détection par une solution d'anticorps anti-cornéodesmosine
10 utilisée au 1/12500 et d'anticorps secondaires couplés à la peroxydase permet de révéler la cornéodesmosine. Les bandes détectées par chimio-luminescence sont quantifiées à l'aide du logiciel Quantity One® de la société Biorad. Les membranes sont ensuite colorées à l'amido-black, puis scannées. En outre, les kératines qui sont des protéines majoritaires des extraits cornéocytaires sont quantifiées afin de vérifier l'ajustement à 0,6 mg/ml de tous les
15 échantillons.

Un témoin positif de dégradation (+) est préparé en utilisant 5 mM d'EDTA. Un essai est réalisé en présence de 60 µg de SASPase activée. Un témoin négatif représente la dégradation naturelle de la cornéodesmosine dans les conditions opératoires du test.

20 d) Résultats

TABLEAU II

	Cornéodesmosine normalisée		Cornéodesmosine résiduelle %
	T0	T24h	T24h/T0*100
SASPase activée	33107	24918	75
Témoin +	31657	26685	84
Témoin -	32701	30546	93

On constate une diminution significative du pourcentage de cornéodesmosine résiduelle lorsque les poudres acétoniques de stratum corneum sont mises en contact avec
25 la SASPase activée (SEQ ID NO : 6) par rapport aux témoins.

EXEMPLE XII - Recherche de substrat pour la mise en évidence de l'activité SASPase :

On utilise le substrat peptidique considéré (SEQ ID NO : 31, SEQ ID NO :32, 5 SEQ ID NO : 33, SEQ ID NO : 34 ou SEQ ID NO : 35) quenché à l'aide du système fluorescent Abz/(NO₂)Tyr à raison de 100µM dans DMSO puis on ajoute 10µL de cette solution mère de substrat pour 100µl de tampon acétate 0,1M pH 5,00.

On ajoute 10 µg de GST-C27 (protéine de fusion à 1 mg/ml dans du PBS). Incubation 37°C. La lecture de fluorescence est réalisée à 340/450nm sur lecteur de 10 plaques de type Biolumin à différents temps. Les résultats sont présentés en figure 5.

On note que le peptide naturel (wt) est bien hydrolysé par la SASPase mais des substitutions d'acides aminés dans la séquence de ce peptide peuvent générer des substrats pour lesquels la SASPase possède plus d'affinité.

Une recherche (base MEROPS) sur les différentes protéases capables de couper 15 les liaisons peptidiques hydrolysées ou hydrolysables par la SASPase (combinaisons des différents acides aminés trouvés en position P1 avec les acides aminés trouvés en position P2 des séquences hydrolysées par la SASPase) font apparaître, en parallèle avec des protéases de type rétroviral, des protéases qui ont été décrites comme importantes pour 20 peau : la SCCE (desquamation, conversion de la proIL1B) les MMP1, 2 et 9 (cicatrisation...), La mu Calpaïn (maturation de l'enveloppe cornée, processing de la filaggrine), la thrombine (activation de « Protease Activated Receptors »), les convertases 1,2,4,5 et 7 (processing de la filaggrine, régulation de la différenciation...).

Ces constatations renforcent l'idée d'un rôle important de la SASPase dans la physiologie cutanée.

REVENDICATIONS

1. Composition cosmétique ou pharmaceutique comprenant dans un milieu physiologiquement acceptable, au moins un polypeptide naturel ou synthétique purifié dont
5 la séquence peptidique est représentée en tout ou partie par au moins une séquence choisie parmi SEQ ID NO : 1, SEQ ID NO : 4, SEQ ID NO : 5, SEQ ID NO : 6, SEQ ID NO : 7, SEQ ID NO : 8 ; SEQ ID NO : 9, SEQ ID NO : 16, SEQ ID NO : 25 et SEQ ID NO : 27 et leurs homologues.

2. Composition selon la revendication 1, caractérisée en ce que ledit
10 polypeptide possède une séquence peptidique représentée par SEQ ID NO : 5, SEQ ID NO : 6, SEQ ID NO : 7, SEQ ID NO : 16, SEQ ID NO : 25 ou SEQ ID NO : 27.

3. Composition selon la revendication 1 ou 2, caractérisée en ce que ledit polypeptide se présente sous une forme multimère et de préférence dimère.

4. Composition selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, caractérisée
15 en ce que ledit polypeptide a subi une ou plusieurs modifications post-traductionnelles.

5. Composition selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, caractérisée en ce que ledit polypeptide se présente sous la forme d'un polypeptide de séquence SEQ ID NO : 5, SEQ ID NO : 6, SEQ ID NO : 7, SEQ ID NO : 16, SEQ ID NO : 25 ou SEQ ID NO : 27 fusionné avec un autre polypeptide, un agent de ciblage hydrophile ou
20 hydrophobe ou un précurseur de bioconversion.

6. Composition cosmétique ou pharmaceutique caractérisée en ce qu'elle comprend dans un milieu physiologiquement acceptable, au moins un mélange de polypeptides issu de la protéolyse d'un polypeptide dont la séquence est représentée en tout ou partie par la séquence SEQ ID NO : 5, SEQ ID NO : 6, SEQ ID NO : 7,
25 SEQ ID NO : 16, SEQ ID NO : 25 ou SEQ ID NO : 27 ou leurs homologues et plus particulièrement dont la séquence est représentée par SEQ ID NO : 5, SEQ ID NO : 6, SEQ ID NO : 7, SEQ ID NO : 16, SEQ ID NO : 25 ou SEQ ID NO : 27.

7. Procédé de traitement cosmétique destiné à lutter contre les troubles cutanés liés à un dysfonctionnement de la prolifération et/ou de la différenciation
30 cellulaire, caractérisé en ce que l'on applique sur la peau, les muqueuses et/ou les fibres kératiniques une composition cosmétique comprenant au moins un polypeptide dont la séquence peptidique comprend au moins une séquence choisie parmi SEQ ID NO : 1,

SEQ ID NO : 4, SEQ ID NO : 5, SEQ ID NO : 6, SEQ ID NO : 7, SEQ ID NO : 8, SEQ ID NO : 9, SEQ ID NO : 16, SEQ ID NO : 25 et SEQ ID NO : 27 et leurs homologues ou un mélange issu de la protéolyse dudit polypeptide.

8. Procédé selon la revendication 7, caractérisé en ce que ledit polypeptide
5 possède la séquence SEQ ID NO : 5, SEQ ID NO : 6, SEQ ID NO : 7, SEQ ID NO : 16, SEQ ID NO : 25 ou SEQ ID NO : 27.

9. Procédé de traitement cosmétique selon la revendication 7 ou 8, caractérisé en ce qu'il vise à traiter les peaux sèches, l'hyperkératose, la parakératose, les troubles de la sébogénèse, les néoplasies et/ou les signes de vieillissement cutané.

10 10. Utilisation d'un polypeptide dont la séquence peptidique comprend au moins une séquence choisie parmi SEQ ID NO : 1, SEQ ID NO : 4, SEQ ID NO : 5, SEQ ID NO : 6, SEQ ID NO : 7, SEQ ID NO : 8, SEQ ID NO : 9, SEQ ID NO : 16, SEQ ID NO : 25 et SEQ ID NO : 27 et leurs homologues et plus particulièrement dont
15 ladite séquence peptidique est représentée en tout ou partie par SEQ ID NO : 5, SEQ ID NO : 6, SEQ ID NO : 7, SEQ ID NO : 16, SEQ ID NO : 25 ou SEQ ID NO : 27, ou d'un mélange issu de la protéolyse dudit polypeptide pour la préparation d'une composition pharmaceutique destinée au traitement des infections dermatologiques.

11. Utilisation selon la revendication 10, caractérisée en ce que la composition pharmaceutique est destinée à traiter l'ichtyose, le psoriasis, l'eczéma, la rosacée, les
20 lichens, les prurits, ou toutes pathologies impliquant une hyperkératose, une parakératose ou ayant une composante inflammatoire.

12. Utilisation d'un polypeptide dont la séquence peptidique comprend au moins une séquence choisie parmi SEQ ID NO : 1, SEQ ID NO : 4, SEQ ID NO : 5, SEQ ID NO : 6, SEQ ID NO : 7, SEQ ID NO : 8, SEQ ID NO : 9, SEQ ID NO : 16, SEQ ID NO : 25 et SEQ ID NO : 27 et leurs homologues pour la
25 préparation d'une composition antivirale.

13. Utilisation selon la revendication 12, caractérisée en ce que ladite séquence peptidique est représentée par SEQ ID NO : 5, SEQ ID NO : 6, SEQ ID NO : 7, SEQ ID NO : 16, SEQ ID NO : 25 ou SEQ ID NO : 27.

30 14. Utilisation d'un composé chimique ou biologique pour la préparation d'une composition destinée à interagir avec ou à moduler l'activité biologique d'un polypeptide dont la séquence peptidique comprend au moins une séquence choisie parmi

SEQ ID NO : 1, SEQ ID NO : 4, SEQ ID NO : 5, SEQ ID NO : 6, SEQ ID NO : 7, SEQ ID NO : 8, SEQ ID NO : 9, SEQ ID NO : 16, SEQ ID NO : 25 et SEQ ID NO : 27 et leurs homologues et plus particulièrement dont la séquence peptidique est représentée par SEQ ID NO : 5, SEQ ID NO : 6, SEQ ID NO : 7, SEQ ID NO : 16, SEQ ID NO : 25 ou
5 SEQ ID NO : 27.

15. Utilisation selon la revendication 14, caractérisée en ce que le composé est une protéase présentant un site spécifique de reconnaissance et/ou de fixation et de coupure au sein de la séquence dudit polypeptide.

16. Utilisation selon la revendication 14, caractérisée en ce que le composé est
10 un inhibiteur choisi de préférence parmi les inhibiteurs de rétropepsines.

17. Utilisation selon la revendication 14, caractérisée en ce que le composé est un activateur.

18. Utilisation selon la revendication 14, caractérisée en ce que le composé est un anticorps spécifique dudit polypeptide.

19. Utilisation d'un polypeptide dont la séquence peptidique est représentée par
15 au moins une séquence choisie parmi SEQ ID NO : 31, SEQ ID NO : 32, SEQ ID NO : 33, SEQ ID NO : 34 et SEQ ID NO : 35, pour préparer une composition destinée à moduler l'activité de la SASPase.

20. Composition cosmétique ou pharmaceutique, caractérisée en ce qu'elle
20 comprend dans un milieu physiologiquement acceptable, au moins une séquence nucléotidique codant un polypeptide tel que défini en revendications 1 à 5, ou une séquence sens, antisens ou antisens interférentiel correspondant à ladite séquence nucléotidique.

21. Composition selon la revendication 20, caractérisée en ce que ladite
25 séquence nucléotidique est constituée de la séquence nucléotidique codante SEQ ID NO : 20, SEQ ID NO : 24, SEQ ID NO : 26 ou SEQ ID NO : 28.

22. Utilisation d'un composé biologique ou chimique pour la préparation d'une composition destinée à inhiber la dimérisation d'un polypeptide de séquence
SEQ ID NO : 5, SEQ ID NO : 6, SEQ ID NO : 16, SEQ ID NO : 25 ou SEQ ID NO : 27.

23. Utilisation d'un polypeptide dont la séquence peptidique est choisie parmi
30 SEQ ID NO : 1, SEQ ID NO : 4, SEQ ID NO : 5, SEQ ID NO : 6, SEQ ID NO : 7, SEQ ID NO : 8, SEQ ID NO : 9, SEQ ID NO : 16, SEQ ID NO : 25 et SEQ ID NO : 27 et

leurs homologues à titre d'outil de criblage.

24. Utilisation d'un polypeptide dont la séquence peptidique est choisie parmi
SEQ ID NO : 1, SEQ ID NO : 4, SEQ ID NO : 5, SEQ ID NO : 6, SEQ ID NO : 7,
SEQ ID NO : 8, SEQ ID NO : 9, SEQ ID NO : 16, SEQ ID NO : 25 et SEQ ID NO : 27 et
5 leurs homologues pour la préparation d'un outil de diagnostic.

25. Utilisation d'un polypeptide dont la séquence peptidique est choisie parmi
SEQ ID NO : 1, SEQ ID NO : 4, SEQ ID NO : 5, SEQ ID NO : 6, SEQ ID NO : 7,
SEQ ID NO : 8, SEQ ID NO : 9, SEQ ID NO : 16, SEQ ID NO : 25 et SEQ ID NO : 27 et
leurs homologues et plus particulièrement d'un polypeptide dont la séquence est
10 représentée par SEQ ID NO : 5, SEQ ID NO : 6, SEQ ID NO : 7, SEQ ID NO : 16,
SEQ ID NO : 25 ou SEQ ID NO : 27, de ses fragments de protéolyse, ou de tout peptide
synthétique déduit de la séquence dudit polypeptide, pour préparer ou purifier,
éventuellement à partir d'épiderme, toute molécule, susceptible de moduler son interaction
avec d'éventuels ligands.

15 26. Utilisation d'un polypeptide dont la séquence peptidique est choisie parmi
SEQ ID NO : 1, SEQ ID NO : 4, SEQ ID NO : 5, SEQ ID NO : 6, SEQ ID NO : 7,
SEQ ID NO : 8, SEQ ID NO : 9, SEQ ID NO : 16, SEQ ID NO : 25 et SEQ ID NO : 27 et
leurs homologues et plus particulièrement d'un polypeptide dont la séquence est
représentée par SEQ ID NO : 5, SEQ ID NO : 6, SEQ ID NO : 7, SEQ ID NO : 16,
20 SEQ ID NO : 25 ou SEQ ID NO : 27, de ses fragments de protéolyse, ou de tout peptide
synthétique déduit de la séquence dudit polypeptide, pour sélectionner de nouvelles
molécules antivirales présentant moins d'effets secondaires.

27. Utilisation d'un polypeptide dont la séquence peptidique est choisie parmi
SEQ ID NO : 1, SEQ ID NO : 4, SEQ ID NO : 5, SEQ ID NO : 6, SEQ ID NO : 7,
25 SEQ ID NO : 8, SEQ ID NO : 9, SEQ ID NO : 16, SEQ ID NO : 25 et SEQ ID NO 27 et
leurs homologues et plus particulièrement d'un polypeptide dont la séquence peptidique est
représentée par SEQ ID NO : 5, SEQ ID NO : 6, SEQ ID NO : 7, SEQ ID NO : 16,
SEQ ID NO : 25 ou SEQ ID NO : 27, de ses fragments de protéolyse, de tout peptide
synthétique déduit de la séquence dudit polypeptide, pour préparer des antisérums et/ou
30 des anticorps monoclonaux spécifiques, visant notamment à purifier ledit polypeptide et
ses fragments ou à moduler son activité.

28. Polypeptide isolé et purifié appartenant à la famille des protéases à acide

aspartique, caractérisé en ce qu'il possède une séquence peptidique représentée par SEQ ID NO : 6, SEQ ID NO : 16, SEQ ID NO : 25 ou SEQ ID NO : 27.

29. Polypeptide selon la revendication 28, caractérisé en ce qu'il possède une masse moléculaire apparente comprise entre 5 et 30 kD, plus particulièrement entre 9 et 15 kD et notamment entre 11 et 14 kD.

30. Polypeptide selon la revendication 28 ou 29, caractérisé en ce qu'il se présente sous une forme multimère et de préférence dimère.

31. Polypeptide selon l'une quelconque des revendications 28 à 30, caractérisé en ce qu'il possède un point isoélectrique théorique compris entre 3 et 9.

32. Polypeptide selon l'une quelconque des revendications 28 à 31, caractérisé en ce qu'il est d'origine naturelle et purifié à partir de tissus de mammifères.

33. Polypeptide selon l'une quelconque des revendications 28 à 32, caractérisé en ce qu'il est purifié à partir de peau humaine et plus particulièrement à partir d'épiderme humain.

34. Polypeptide selon l'une quelconque des revendications 28 à 33, caractérisé en ce qu'il a subi une ou plusieurs modifications post-traductionnelles.

35. Polypeptide selon la revendication 28 ou l'une des revendications 30 à 34, caractérisé en ce qu'il se présente sous la forme d'un polypeptide de séquence SEQ ID NO : 6, SEQ ID NO : 16, SEQ ID NO : 25 ou SEQ ID NO : 27 fusionné avec un autre polypeptide, un agent de ciblage hydrophile ou hydrophobe ou un précurseur de bioconversion.

36. Anticorps poly- ou mono-clonal, caractérisé en ce qu'il reconnaît spécifiquement un polypeptide dont la séquence peptidique est représentée par SEQ ID NO : 5, SEQ ID NO : 6, SEQ ID NO : 16, SEQ ID NO : 25 ou SEQ ID NO : 27.

37. Utilisation d'un anticorps tel que défini dans la revendication 36 pour la fabrication d'une composition destinée au diagnostic d'une déficience ou d'une surexpression de la protéine SASPase.

38. Utilisation d'un anticorps tel que défini dans la revendication 36 pour la fabrication d'une composition destinée à bloquer l'activité et/ou l'activation de la SASPase dans le traitement de pathologies caractérisées par une surexpression et/ou une activité exagérée de la SASPase.

39. Fragment d'acide désoxyribonucléique isolé et purifié codant un

polypeptide tel que défini dans l'une des revendications 28 à 35.

40. Fragment d'acide désoxyribonucléique isolé et purifié constitué de la séquence nucléotidique codante SEQ ID NO : 20, SEQ ID NO : 24, SEQ ID NO : 26 ou SEQ ID NO : 28.

5 41. Vecteur d'expression recombinant contenant tout ou partie de la séquence nucléotidique codante SEQ ID NO : 20, SEQ ID NO : 24, SEQ ID NO : 26 ou SEQ ID NO : 28.

10 42. Utilisation d'au moins une séquence d'acide désoxyribonucléique telle que définie en revendications 39 ou 40 pour préparer une séquence d'acide ribonucléique sens, antisens ou antisens interférentiel.

 43. Acide ribonucléique, sens, antisens ou antisens interférentiel correspondant au moins à la séquence nucléotidique codante SEQ ID NO : 20, SEQ ID NO : 24, SEQ ID NO : 26 ou SEQ ID NO : 28.

15 44. Utilisation d'au moins une séquence sens ou antisens telle que définie en revendication 43 à des fins de clonage ou d'identification d'un polypeptide de séquence SEQ ID NO : 1, SEQ ID NO : 4, SEQ ID NO : 5, SEQ ID NO : 6, SEQ ID NO : 7, SEQ ID NO : 8, SEQ ID NO : 9, SEQ ID NO : 16, SEQ ID NO : 25 ou SEQ ID NO : 27 ou de leurs homologues.

20 45. Utilisation d'au moins une séquence sens ou antisens telle que définie en revendication 43 pour la préparation d'une composition destinée au diagnostic d'un polypeptide de séquence SEQ ID NO : 1, SEQ ID NO : 4, SEQ ID NO : 5, SEQ ID NO : 6, SEQ ID NO : 7, SEQ ID NO : 8, SEQ ID NO : 9, SEQ ID NO : 16, SEQ ID NO : 25 ou SEQ ID NO : 27 ou de leurs homologues.

25

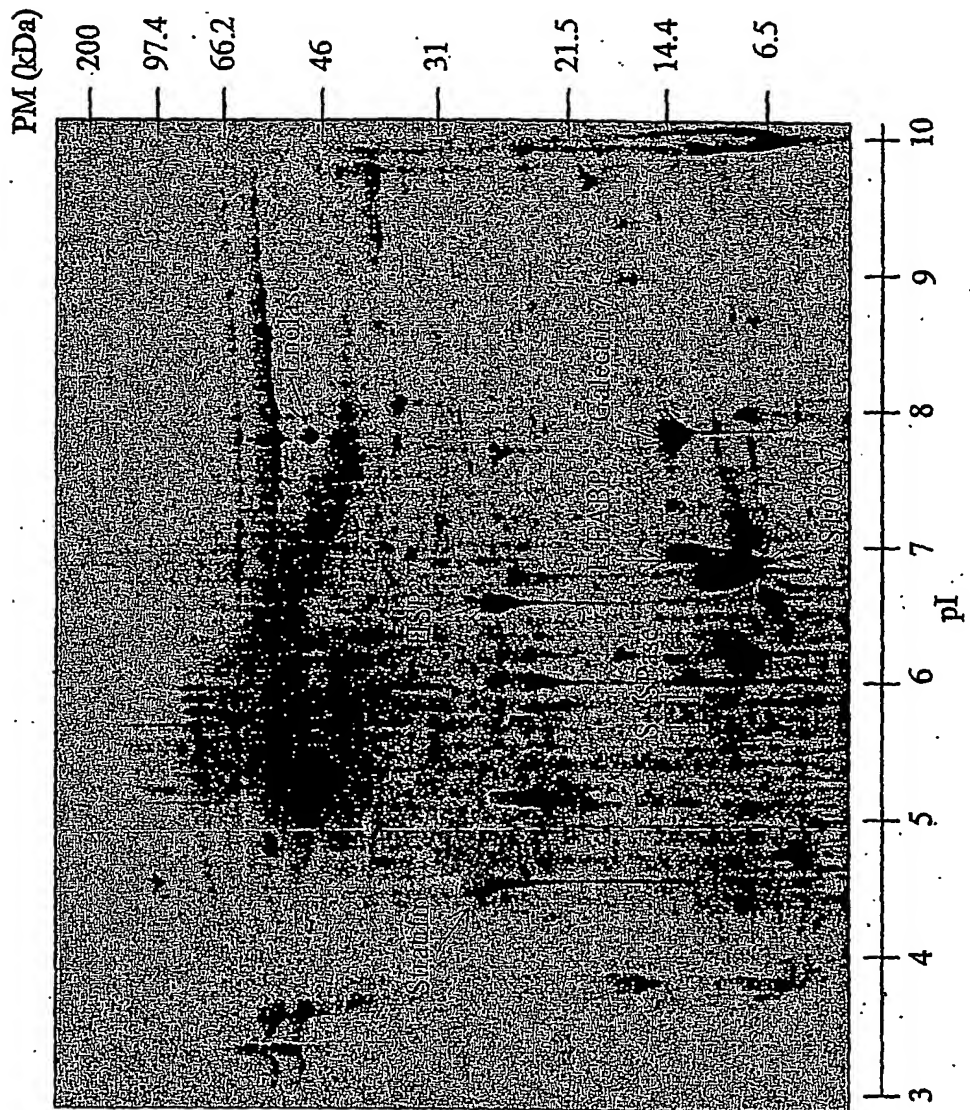


Figure 1

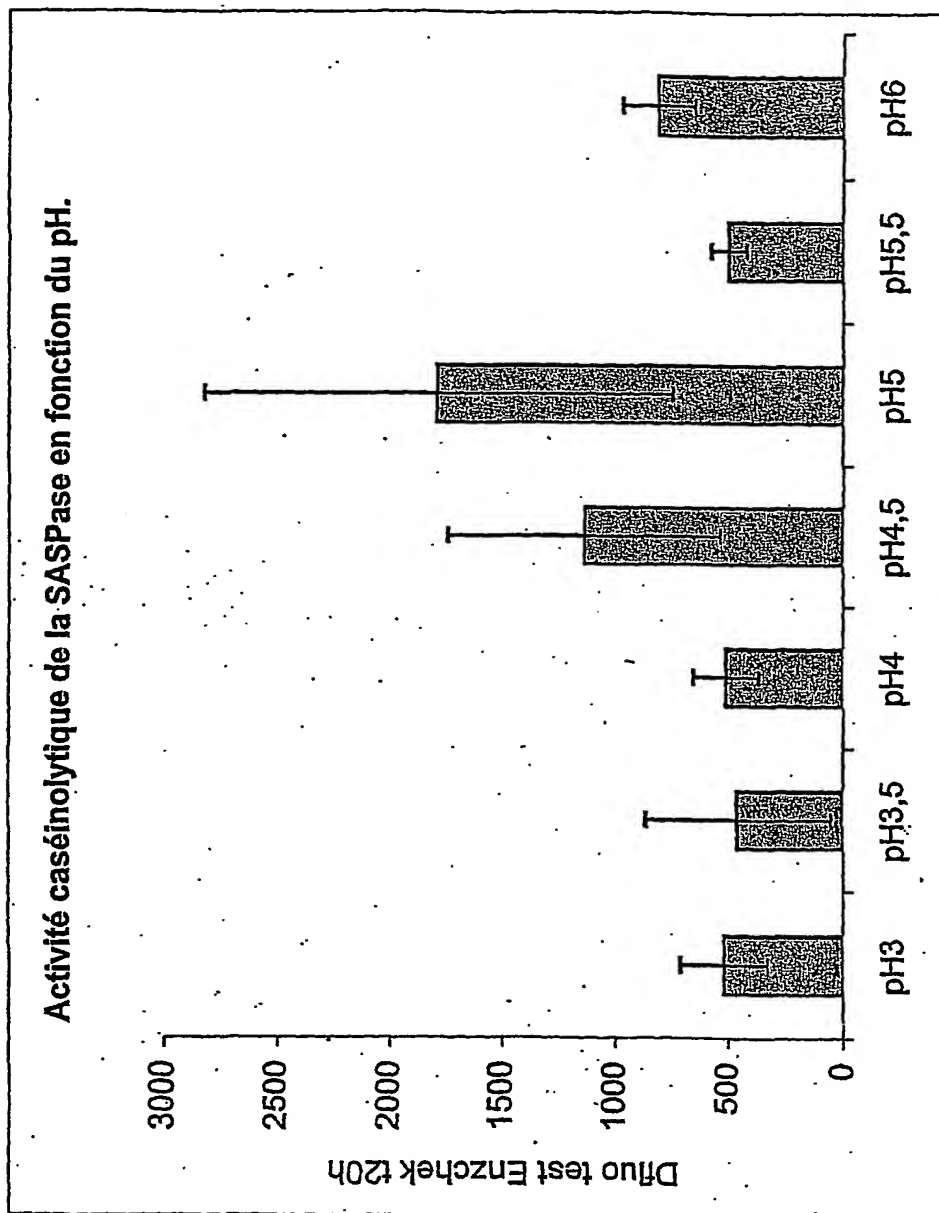


Figure 2

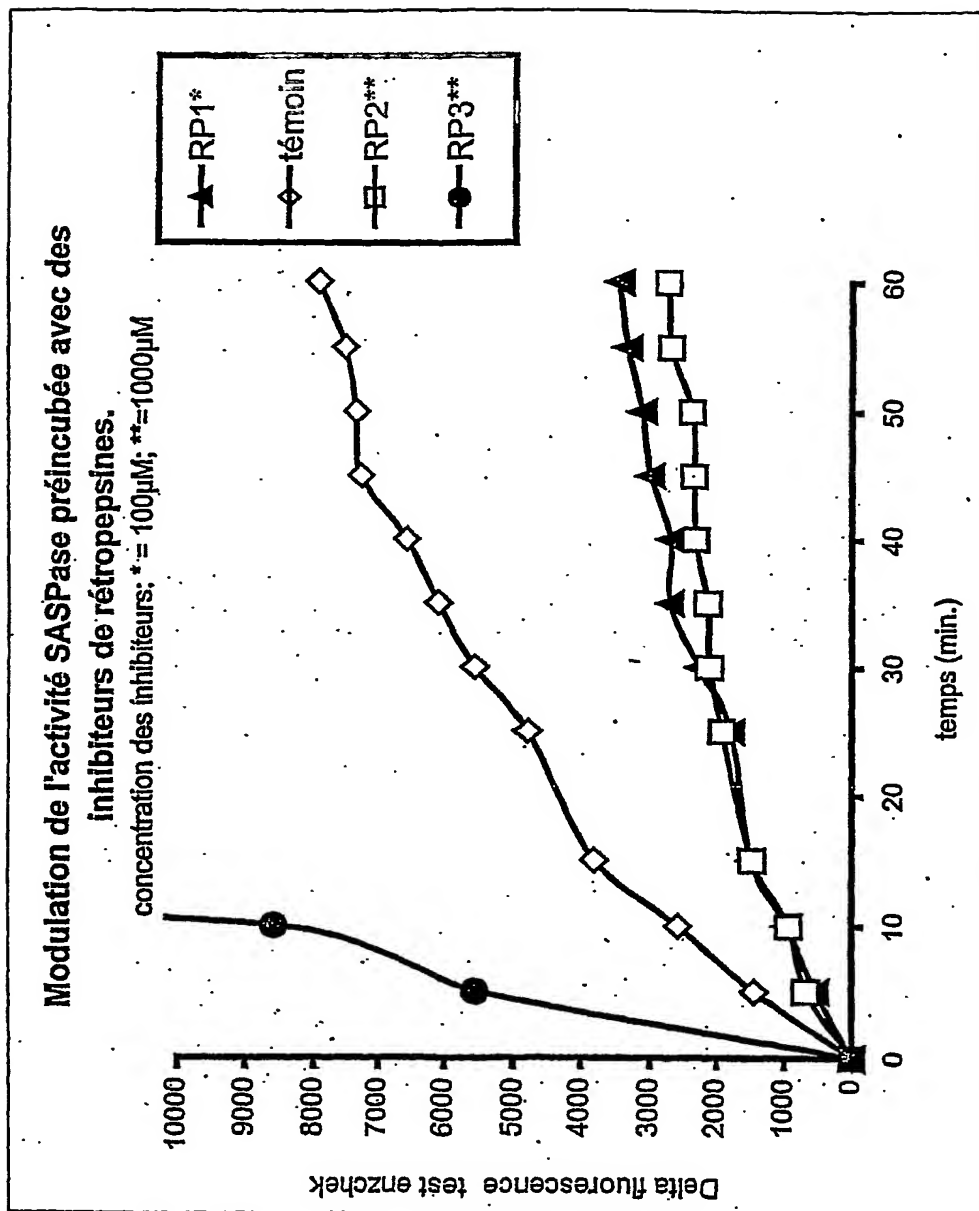


Figure 3

CLUSTAL W (1.81) multiple sequence alignment

```

FIAV  IGFVNYNKVGTTTTLEKRPEILLFVNGYPIKFLDGTGADITILNRRDFQVKN-----SIE 55
HIV2  -----PQFSLWKRPVVTAYIEGQPVLEVLLDTGADDSIVAG--IELGN-----NYS 43
SASPase -----ANSMGKGYLLKGIKGVPRFLVDSGAQVSVVHPNLWEEVTDGDLDTLQ 49
      :: * : : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * :
FIAV  NGRQNMIG-VGGGKRGTNYINVHLEIRDENYKTCIFGNVCVLEDNSLIQPLLGRDNMIK 114
HIV2  ---PKIVGGIGGFINTKEYKNVEIEVLNKKVRATIMTG-----DTPIN-IFGRNIIITA 92
SASPase PFENVVKVANGAEMKILGVWDTAVSLGKLKLAQFLVAN-----ASAEAAIIGTDVLQD 103
      : . * . : . : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
FIAV  ENIRLVMAQ----- 123
HIV2  LGMSLNL----- 99
SASPase HNAILDFFEHRTCTLKGGKFRLLPVGGSLEDEFDLE 138
      * :
```

Figure 4

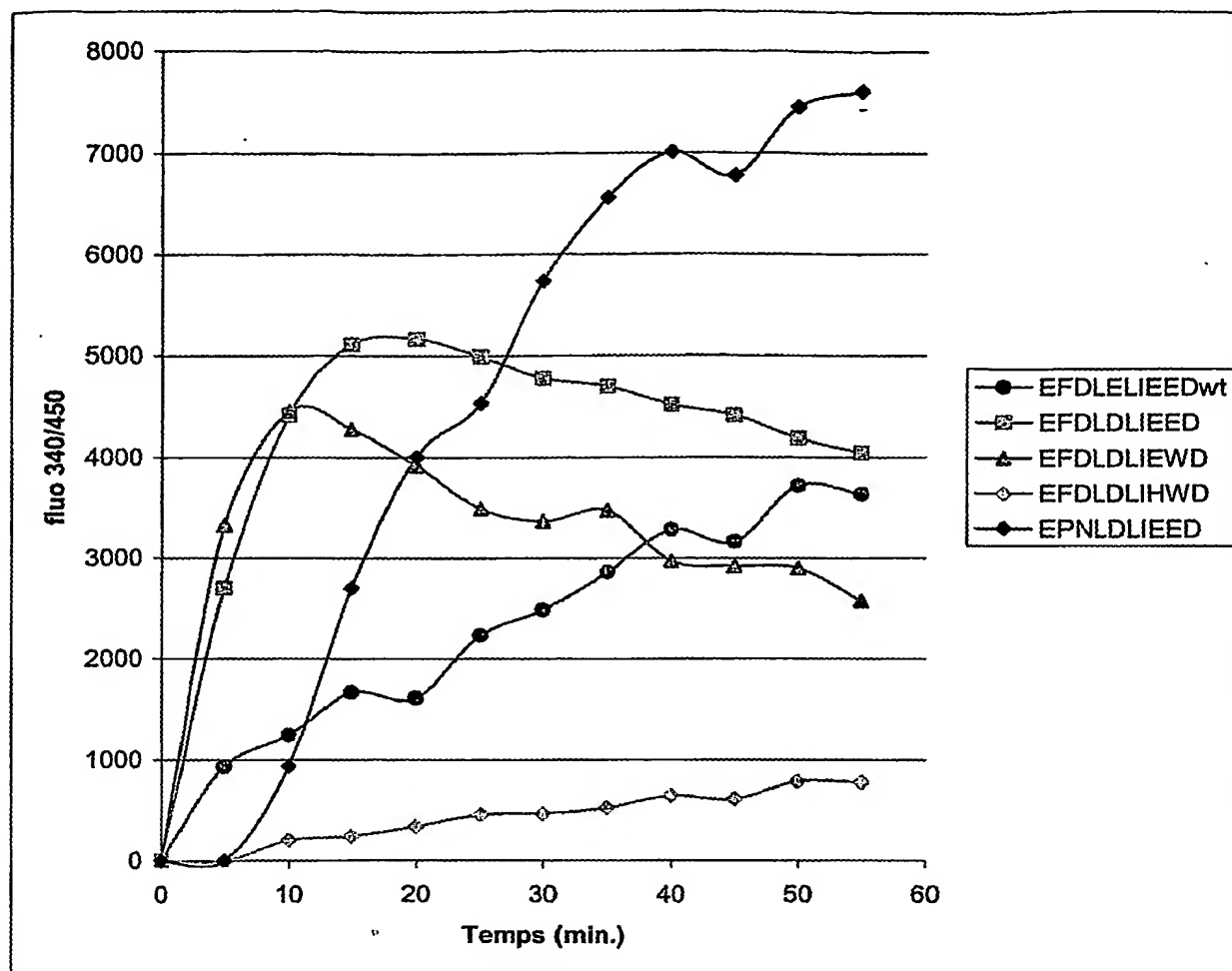


Figure 5

Patentin PCT EASY BR75585.ST25
SEQUENCE LISTING

<110> L'OREAL

<120> Utilisation de protéases aspartiques dans le domaine cosmétique et thérapeutique.

<130> BR75585/CR/PLC/cr

<150> FR 02 08613

<151> 2002-07-09

<160> 36

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1
<211> 12
<212> PRT
<213> Homo Sapiens<400> 1
Phe Leu Val Asp Ser Gly Ala Gln Val Ser Val Val
1 5 10<210> 2
<211> 21
<212> PRT
<213> Homo Sapiens<400> 2
Ala Gln Phe Leu Val Ala Asn Ala Ser Ala Glu Glu Ala Ile Ile Gly
1 5 10 15Thr Asp Val Leu Gln
20<210> 3
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo Sapiens<400> 3
Ile Leu Gly Val Trp Asp Thr Ala Val
1 5<210> 4
<211> 259
<212> PRT
<213> Homo Sapiens

Patentin PCT EASY BR75585.ST25

<400> 4
 Met Ala Gly Ser Gly Ala Arg Ser Glu Glu Gly Arg Arg Gln His Ala
 1 5 10 15
 Phe Val Pro Glu Pro Phe Asp Gly Ala Asn Val Val Pro Asn Leu Trp
 20 25 30
 Leu His Ser Phe Glu Val Ile Asn Asp Leu Asn His Trp Asp His Ile
 35 40 45
 Thr Lys Leu Arg Phe Leu Lys Glu Ser Leu Arg Gly Glu Ala Leu Gly
 50 55 60
 Val Tyr Asn Arg Leu Ser Pro Gln Asp Gln Gly Asp Tyr Gly Thr Val
 65 70 75 80
 Lys Glu Ala Leu Leu Lys Ala Phe Gly Val Pro Gly Ala Ala Pro Ser
 85 90 95
 His Leu Pro Lys Glu Ile Val Phe Ala Asn Ser Met Gly Lys Gly Tyr
 100 105 110
 Tyr Leu Lys Gly Lys Ile Gly Lys Val Pro Val Arg Phe Leu Val Asp
 115 120 125
 Ser Gly Ala Gln Val Ser Val Val His Pro Asn Leu Trp Glu Glu Val
 130 135 140
 Thr Asp Gly Asp Leu Asp Thr Leu Gln Pro Phe Glu Asn Val Val Lys
 145 150 155 160
 Val Ala Asn Gly Ala Glu Met Lys Ile Leu Gly Val Trp Asp Thr Ala
 165 170 175
 Val Ser Leu Gly Lys Leu Lys Leu Lys Ala Gln Phe Leu Val Ala Asn
 180 185 190
 Ala Ser Ala Glu Glu Ala Ile Ile Gly Thr Asp Val Leu Gln Asp His
 195 200 205
 Asn Ala Ile Leu Asp Phe Glu His Arg Thr Cys Thr Leu Lys Gly Lys
 210 215 220
 Lys Phe Arg Leu Leu Pro Val Gly Gly Ser Leu Glu Asp Glu Phe Asp
 225 230 235 240
 Leu Glu Leu Ile Glu Glu Asp Pro Ser Ser Glu Glu Gly Arg Gln Glu
 245 250 255
 Leu Ser His

<210> 5
 <211> 343
 <212> PRT
 <213> Homo Sapiens

<400> 5
 Met Gly Ser Pro Gly Ala Ser Leu Gly Ile Lys Lys Ala Leu Gln Ser
 1 5 10 15
 Glu Gln Ala Thr Ala Leu Pro Ala Ser Ala Pro Ala Val Ser Gln Pro
 20 25 30
 Thr Ala Pro Ala Pro Ser Cys Leu Pro Lys Ala Gly Gln Val Ile Pro
 35 40 45

Patentin PCT EASY BR75585.ST25

Thr Leu Leu Arg Glu Ala Pro Phe Ser Ser Val Ile Ala Pro Thr Leu
 50 55 60
 Leu Cys Gly Phe Leu Phe Leu Ala Trp Val Ala Ala Glu Val Pro Glu
 65 70 75 80
 Glu Ser Ser Arg Met Ala Gly Ser Gly Ala Arg Ser Glu Glu Gly Arg
 85 90 95
 Arg Gln His Ala Phe Val Pro Glu Pro Phe Asp Gly Ala Asn Val Val
 100 105 110
 Pro Asn Leu Trp Leu His Ser Phe Glu Val Ile Asn Asp Leu Asn His
 115 120 125
 Trp Asp His Ile Thr Lys Leu Arg Phe Leu Lys Glu Ser Leu Arg Gly
 130 135 140
 Glu Ala Leu Gly Val Tyr Asn Arg Leu Ser Pro Gln Asp Gln Gly Asp
 145 150 155 160
 Tyr Gly Thr Val Lys Glu Ala Leu Leu Lys Ala Phe Gly Val Pro Gly
 165 170 175
 Ala Ala Pro Ser His Leu Pro Lys Glu Ile Val Phe Ala Asn Ser Met
 180 185 190
 Gly Lys Gly Tyr Tyr Leu Lys Gly Lys Ile Gly Lys Val Pro Val Arg
 195 200 205
 Phe Leu Val Asp Ser Gly Ala Gln Val Ser Val Val His Pro Asn Leu
 210 215 220
 Trp Glu Glu Val Thr Asp Gly Asp Leu Asp Thr Leu Gln Pro Phe Glu
 225 230 235 240
 Asn Val Val Lys Val Ala Asn Gly Ala Glu Met Lys Ile Leu Gly Val
 245 250 255
 Trp Asp Thr Ala Val Ser Leu Gly Lys Leu Lys Leu Lys Ala Gln Phe
 260 265 270
 Leu Val Ala Asn Ala Ser Ala Glu Glu Ala Ile Ile Gly Thr Asp Val
 275 280 285
 Leu Gln Asp His Asn Ala Ile Leu Asp Phe Glu His Arg Thr Cys Thr
 290 295 300
 Leu Lys Gly Lys Lys Phe Arg Leu Leu Pro Val Gly Gly Ser Leu Glu
 305 310 315 320
 Asp Glu Phe Asp Leu Glu Leu Ile Glu Glu Asp Pro Ser Ser Glu Glu
 325 330 335
 Gly Arg Gln Glu Leu Ser His
 340

<210> 6
 <211> 138
 <212> PRT
 <213> Homo Sapiens

<400> 6
 Ala Asn Ser Met Gly Lys Gly Tyr Tyr Leu Lys Gly Lys Ile Gly Lys
 1 5 10 15

Patentin PCT EASY BR75585.ST25

Val Pro Val Arg Phe Leu Val Asp Ser Gly Ala Gln Val Ser Val Val
 20 25 30
 His Pro Asn Leu Trp Glu Glu Val Thr Asp Gly Asp Leu Asp Thr Leu
 35 40 45
 Gln Pro Phe Glu Asn Val Val Lys Val Ala Asn Gly Ala Glu Met Lys
 50 55 60
 Ile Leu Gly Val Trp Asp Thr Ala Val Ser Leu Gly Lys Leu Lys Leu
 65 70 75 80
 Lys Ala Gln Phe Leu Val Ala Asn Ala Ser Ala Glu Glu Ala Ile Ile
 85 90 95
 Gly Thr Asp Val Leu Gln Asp His Asn Ala Ile Leu Asp Phe Glu His
 100 105 110
 Arg Thr Cys Thr Leu Lys Gly Lys Lys Phe Arg Leu Leu Pro Val Gly
 115 120 125
 Gly Ser Leu Glu Asp Glu Phe Asp Leu Glu
 130 135

<210> 7
 <211> 58
 <212> PRT
 <213> Homo Sapiens

<400> 7
 Met Gly Ser Pro Gly Ala Ser Leu Gly Ile Lys Lys Ala Leu Gln Ser
 1 5 10 15
 Glu Gln Ala Thr Ala Leu Pro Ala Ser Ala Pro Ala Val Ser Gln Pro
 20 25 30
 Thr Ala Pro Ala Pro Ser Cys Leu Pro Lys Ala Gly Gln Val Ile Pro
 35 40 45
 Thr Leu Leu Arg Glu Ala Pro Phe Ser Ser
 50 55

<210> 8
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Homo Sapiens

<400> 8
 Val Ile Ala Pro Thr Leu Leu Cys Gly Phe Leu Phe Leu Ala Trp Val
 1 5 10 15
 Ala Ala

<210> 9
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Homo Sapiens

<400> 9
 Leu Ile Glu Glu Asp Pro Ser Ser Glu Glu Gly Arg Gln Glu Leu Ser
 1 5 10 15
 His

Patentin PCT EASY BR75585.ST25

<210> 10
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Amorce SC140 d'amplification par PCR de fragments d'ADNc codant pour la SASPase complète.

<400> 10
taggatccat ggggagccca ggggc 25

<210> 11
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Amorce SC131 d'amplification par PCR d'ADNc codant pour la SASPase complète ou pour la forme tronquée SASPase Delta 1-84.

<400> 11
ttgaattctc agtgggatag ctctgccgc 30

<210> 12
<211> 33
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Amorce SC130 d'amplification par PCR d'ADNc codant pour la SASPase dite Delta 1-84.

<400> 12
gataggatcc atggccggga gcggagccag gag 33

<210> 13
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Amorce SC134 d'amplification par RT-PCR.

<400> 13
ggccctgggt gtctacaata 20

<210> 14
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Amorce SC135 d'amplification par RT-PCR.

<400> 14
ttggccacct ttaccacatt 20

<210> 15
<211> 25

Patentin PCT EASY BR75585.ST25

<212> PRT
 <213> Homo Sapiens

<400> 15
 Phe Val Asn Gln His Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu Tyr
 1 5 10 15

Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe Phe
 20 25

<210> 16
 <211> 136
 <212> PRT
 <213> Homo Sapiens

<400> 16
 Ser Met Gly Lys Gly Tyr Tyr Leu Lys Gly Lys Ile Gly Lys Val Pro
 1 5 10 15

Val Arg Phe Leu Val Asp Ser Gly Ala Gln Val Ser Val Val His Pro
 20 25 30

Asn Leu Trp Glu Glu Val Thr Asp Gly Asp Leu Asp Thr Leu Gln Pro
 35 40 45

Phe Glu Asn Val Val Lys Val Ala Asn Gly Ala Glu Met Lys Ile Leu
 50 55 60

Gly Val Trp Asp Thr Ala Val Ser Leu Gly Lys Leu Lys Leu Lys Ala
 65 70 75 80

Gln Phe Leu Val Ala Asn Ala Ser Ala Glu Glu Ala Ile Ile Gly Thr
 85 90 95

Asp Val Leu Gln Asp His Asn Ala Ile Leu Asp Phe Glu His Arg Thr
 100 105 110

Cys Thr Leu Lys Gly Lys Lys Phe Arg Leu Leu Pro Val Gly Gly Ser
 115 120 125

Leu Glu Asp Glu Phe Asp Leu Glu
 130 135

<210> 17
 <211> 36
 <212> DNA
 <213> Homo Sapiens

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(36)
 <223>

<400> 17
 ttc ctg gtg gac tct ggg gcc cag gtc tct gtg gtc
 Phe Leu Val Asp Ser Gly Ala Gln Val Ser Val Val
 1 5 10

36

<210> 18
 <211> 777
 <212> DNA
 <213> Homo Sapiens

<220>
 <221> CDS

Patentin PCT EASY BR75585.ST25

<222> (1)..(777)

<223>

<400> 18

atg gcc ggg agc gga gcc agg agt gag gaa ggc cgc cgg cag cat gcc	48
Met Ala Gly Ser Gly Ala Arg Ser Glu Glu Gly Arg Arg Gln His Ala	
1 5 10 15	
ttc gtc ccg gaa cct ttt gat ggg gcc aat gtc gtc cca aac ctc tgg	96
Phe Val Pro Glu Pro Phe Asp Gly Ala Asn Val Val Pro Asn Leu Trp	
20 25 30	
ctg cac agc ttt gaa gtc atc aat gac ctc aac cat tgg gac cat atc	144
Leu His Ser Phe Glu Val Ile Asn Asp Leu Asn His Trp Asp His Ile	
35 40 45	
acc aag cta agg ttc ctg aaa gag tcc ctc aga gga gag gcc ctg ggt	192
Thr Lys Leu Arg Phe Leu Lys Glu Ser Leu Arg Gly Glu Ala Leu Gly	
50 55 60	
gtc tac aat agg ctc agt ccc cag gac cag gga gac tat ggg act gtg	240
Val Tyr Asn Arg Leu Ser Pro Gln Asp Gln Gly Asp Tyr Gly Thr Val	
65 70 75 80	
aaa gag gcc ctc ctg aag gcc ttt ggg gtc cct ggg gct gcc ccc agc	288
Lys Glu Ala Leu Leu Lys Ala Phe Gly Val Pro Gly Ala Ala Pro Ser	
85 90 95	
cac ctg ccc aaa gag atc gtc ttt gcc aac agc atg ggt aag ggc tac	336
His Leu Pro Lys Glu Ile Val Phe Ala Asn Ser Met Gly Lys Gly Tyr	
100 105 110	
tat ctc aag ggg aag att ggc aaa gtg ccc gtg agg ttc ctg gtg gac	384
Tyr Leu Lys Gly Lys Ile Gly Lys Val Pro Val Arg Phe Leu Val Asp	
115 120 125	
tct ggg gcc cag gtc tct gtg gtc cac cca aac ttg tgg gag gag gtc	432
Ser Gly Ala Gln Val Ser Val Val His Pro Asn Leu Trp Glu Glu Val	
130 135 140	
act gat ggc gat ctg gac acc ctg cag ccc ttt gag aat gtg gta aag	480
Thr Asp Gly Asp Leu Asp Thr Leu Gln Pro Phe Glu Asn Val Val Lys	
145 150 155 160	
gtg gcc aat ggt gct gaa atg aag atc ctg ggt gtc tgg gat aca gcg	528
Val Ala Asn Gly Ala Glu Met Lys Ile Leu Gly Val Trp Asp Thr Ala	
165 170 175	
gtg tcc cta ggc aag ctg aag ctg aag gca cag ttc cta gtg gcc aat	576
Val Ser Leu Gly Lys Leu Lys Leu Lys Ala Gln Phe Leu Val Ala Asn	
180 185 190	
gcg agt gcc gag gaa gcc atc att ggc act gat gtg ctc cag gac cac	624
Ala Ser Ala Glu Glu Ala Ile Ile Gly Thr Asp Val Leu Gln Asp His	
195 200 205	
aat gct atc ctg gac ttt gag cac cgc aca tgc acc ctg aaa ggg aag	672
Asn Ala Ile Leu Asp Phe Glu His Arg Thr Cys Thr Leu Lys Gly Lys	
210 215 220	
aag ttt cgc ctt ctg cct gtg gga ggg tcc ctg gaa gat gag ttt gac	720
Lys Phe Arg Leu Leu Pro Val Gly Gly Ser Leu Glu Asp Glu Phe Asp	
225 230 235 240	
ctg gag ctc ata gag gag gac ccc tcc tca gaa gaa ggg cgg cag gag	768
Leu Glu Leu Ile Glu Glu Asp Pro Ser Ser Glu Glu Gly Arg Gln Glu	
245 250 255	

Patentin PCT EASY BR75585.ST25

cta tcc cac
Leu Ser His

777

<210> 19
 <211> 1029
 <212> DNA
 <213> Homo Sapiens

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(1029)
 <223>

<400> 19

atg ggg agc cca ggg gcc agc cta ggc atc aaa aag gct ctg cag agt	48
Met Gly Ser Pro Gly Ala Ser Leu Gly Ile Lys Lys Ala Leu Gln Ser	
1 5 10 15	
gaa cag gcc aca gca ctg cct gcc tct gcc cca gca gtc agc cag ccg	96
Glu Gln Ala Thr Ala Leu Pro Ala Ser Ala Pro Ala Val Ser Gln Pro	
20 25 30	
acc gcg cct gct ccc tcc tgc ttg ccc aag gcc gga caa gtc atc ccc	144
Thr Ala Pro Ala Pro Ser Cys Leu Pro Lys Ala Gly Gln Val Ile Pro	
35 40 45	
act ctg ctt cga gag gcc ccg ttt tcc agc gtg att gcg ccg aca ctg	192
Thr Leu Leu Arg Glu Ala Pro Phe Ser Ser Val Ile Ala Pro Thr Leu	
50 55 60	
ctc tgt ggg ttt ctc ttc ttg gcg tgg gtt gct gct gag gtt cca gag	240
Leu Cys Gly Phe Leu Phe Leu Ala Trp Val Ala Ala Glu Val Pro Glu	
65 70 75 80	
gag agc agc agg atg gcc ggg agc gga gcc agg agt gag gaa ggc cgc	288
Glu Ser Ser Arg Met Ala Gly Ser Gly Ala Arg Ser Glu Glu Gly Arg	
85 90 95	
cgg cag cat gcc ttc gtc ccg gaa cct ttt gat ggg gcc aat gtc gtc	336
Arg Gln His Ala Phe Val Pro Glu Pro Phe Asp Gly Ala Asn Val Val	
100 105 110	
cca aac ctc tgg ctg cac agc ttt gaa gtc atc aat gac ctc aac cat	384
Pro Asn Leu Trp Leu His Ser Phe Glu Val Ile Asn Asp Leu Asn His	
115 120 125	
tgg gac cat atc acc aag cta agg ttc ctg aaa gag tcc ctc aga gga	432
Trp Asp His Ile Thr Lys Leu Arg Phe Leu Lys Glu Ser Leu Arg Gly	
130 135 140	
gag gcc ctg ggt gtc tac aat agg ctc agt ccc cag gac cag gga gac	480
Glu Ala Leu Gly Val Tyr Asn Arg Leu Ser Pro Gln Asp Gln Gly Asp	
145 150 155 160	
tat ggg act gtg aaa gag gcc ctc ctg aag gcc ttt ggg gtc cct ggg	528
Tyr Gly Thr Val Lys Glu Ala Leu Leu Lys Ala Phe Gly Val Pro Gly	
165 170 175	
gct gcc ccc agc cac ctg ccc aaa gag atc gtc ttt gcc aac agc atg	576
Ala Ala Pro Ser His Leu Pro Lys Glu Ile Val Phe Ala Asn Ser Met	
180 185 190	
ggt aag ggc tac tat ctc aag ggg aag att ggc aaa gtg ccc gtg agg	624
Gly Lys Gly Tyr Tyr Leu Lys Gly Lys Ile Gly Lys Val Pro Val Arg	
195 200 205	

Patentin PCT EASY BR75585.ST25																
ttc	ctg	gtg	gac	tct	ggg	gcc	cag	gtc	tct	gtg	gtc	cac	cca	aac	ttg	672
Phe	Leu	Val	Asp	Ser	Gly	Ala	Gln	Val	Ser	Val	Val	His	Pro	Asn	Leu	
	210					215					220					
tgg	gag	gag	gtc	act	gat	ggc	gat	ctg	gac	acc	ctg	cag	ccc	ttt	gag	720
Trp	Glu	Glu	Val	Thr	Asp	Gly	Asp	Leu	Asp	Thr	Leu	Gln	Pro	Phe	Glu	
225					230					235					240	
aat	gtg	gta	aag	gtg	gcc	aat	ggt	gct	gaa	atg	aag	atc	ctg	ggt	gtc	768
Asn	Val	Val	Lys	Val	Ala	Asn	Gly	Ala	Glu	Met	Lys	Ile	Leu	Gly	Val	
				245					250					255		
tgg	gat	aca	gcg	gtg	tcc	cta	ggc	aag	ctg	aag	ctg	aag	gca	cag	ttc	816
Trp	Asp	Thr	Ala	Val	Ser	Leu	Gly	Lys	Leu	Lys	Leu	Lys	Ala	Gln	Phe	
			260					265					270			
cta	gtg	gcc	aat	gcg	agt	gcc	gag	gaa	gcc	atc	att	ggc	act	gat	gtg	864
Leu	Val	Ala	Asn	Ala	Ser	Ala	Glu	Glu	Ala	Ile	Ile	Gly	Thr	Asp	Val	
		275					280					285				
ctc	cag	gac	cac	aat	gct	atc	ctg	gac	ttt	gag	cac	cgc	aca	tgc	acc	912
Leu	Gln	Asp	His	Asn	Ala	Ile	Leu	Asp	Phe	Glu	His	Arg	Thr	Cys	Thr	
	290					295					300					
ctg	aaa	ggg	aag	aag	ttt	cgc	ctt	ctg	cct	gtg	gga	ggg	tcc	ctg	gaa	960
Leu	Lys	Gly	Lys	Lys	Phe	Arg	Leu	Leu	Pro	Val	Gly	Gly	Ser	Leu	Glu	
305					310					315					320	
gat	gag	ttt	gac	ctg	gag	ctc	ata	gag	gag	gac	ccc	tcc	tca	gaa	gaa	1008
Asp	Glu	Phe	Asp	Leu	Glu	Leu	Ile	Glu	Glu	Asp	Pro	Ser	Ser	Glu	Glu	
				325					330					335		
ggg	cgg	cag	gag	cta	tcc	cac										1029
Gly	Arg	Gln	Glu	Leu	Ser	His										
			340													
<210> 20																
<211> 414																
<212> DNA																
<213> Homo Sapiens																
<220>																
<221> CDS																
<222> (1)..(414)																
<223>																
<400> 20																
gcc	aac	agc	atg	ggt	aag	ggc	tac	tat	ctc	aag	ggg	aag	att	ggc	aaa	48
Ala	Asn	Ser	Met	Gly	Lys	Gly	Tyr	Tyr	Leu	Lys	Gly	Lys	Ile	Gly	Lys	
1				5					10					15		
gtg	ccc	gtg	agg	ttc	ctg	gtg	gac	tct	ggg	gcc	cag	gtc	tct	gtg	gtc	96
Val	Pro	Val	Arg	Phe	Leu	Val	Asp	Ser	Gly	Ala	Gln	Val	Ser	Val	Val	
			20					25					30			
cac	cca	aac	ttg	tgg	gag	gag	gtc	act	gat	ggc	gat	ctg	gac	acc	ctg	144
His	Pro	Asn	Leu	Trp	Glu	Glu	Val	Thr	Asp	Gly	Asp	Leu	Asp	Thr	Leu	
		35					40					45				
cag	ccc	ttt	gag	aat	gtg	gta	aag	gtg	gcc	aat	ggt	gct	gaa	atg	aag	192
Gln	Pro	Phe	Glu	Asn	Val	Val	Lys	Val	Ala	Asn	Gly	Ala	Glu	Met	Lys	
	50					55					60					
atc	ctg	ggt	gtc	tgg	gat	aca	gcg	gtg	tcc	cta	ggc	aag	ctg	aag	ctg	240
Ile	Leu	Gly	Val	Trp	Asp	Thr	Ala	Val	Ser	Leu	Gly	Lys	Leu	Lys	Leu	
65					70					75					80	

Patentin PCT EASY BR75585.ST25

aag gca cag ttc cta gtg gcc aat gcg agt gcc gag gaa gcc atc att 288
 Lys Ala Gln Phe Leu Val Ala Asn Ala Ser Ala Glu Glu Ala Ile Ile
 85 90 95
 ggc act gat gtg ctc cag gac cac aat gct atc ctg gac ttt gag cac 336
 Gly Thr Asp Val Leu Gln Asp His Asn Ala Ile Leu Asp Phe Glu His
 100 105 110
 cgc aca tgc acc ctg aaa ggg aag aag ttt cgc ctt ctg cct gtg gga 384
 Arg Thr Cys Thr Leu Lys Gly Lys Lys Phe Arg Leu Leu Pro Val Gly
 115 120 125
 ggg tcc ctg gaa gat gag ttt gac ctg gag 414
 Gly Ser Leu Glu Asp Glu Phe Asp Leu Glu
 130 135

<210> 21
 <211> 174
 <212> DNA
 <213> Homo Sapiens

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(174)
 <223>

<400> 21
 atg ggg agc cca ggg gcc agc cta ggc atc aaa aag gct ctg cag agt 48
 Met Gly Ser Pro Gly Ala Ser Leu Gly Ile Lys Lys Ala Leu Gln Ser
 1 5 10 15
 gaa cag gcc aca gca ctg cct gcc tct gcc cca gca gtc agc cag ccg 96
 Glu Gln Ala Thr Ala Leu Pro Ala Ser Ala Pro Ala Val Ser Gln Pro
 20 25 30
 acc gcg cct gct ccc tcc tgc ttg ccc aag gcc gga caa gtc atc ccc 144
 Thr Ala Pro Ala Pro Ser Cys Leu Pro Lys Ala Gly Gln Val Ile Pro
 35 40 45
 act ctg ctt cga gag gcc ccg ttt tcc agc 174
 Thr Leu Leu Arg Glu Ala Pro Phe Ser Ser
 50 55

<210> 22
 <211> 54
 <212> DNA
 <213> Homo Sapiens

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(54)
 <223>

<400> 22
 gtg att gcg ccg aca ctg ctc tgt ggg ttt ctc ttc ttg gcg tgg gtt 48
 Val Ile Ala Pro Thr Leu Leu Cys Gly Phe Leu Phe Leu Ala Trp Val
 1 5 10 15
 gct gct
 Ala Ala 54

<210> 23
 <211> 51
 <212> DNA
 <213> Homo Sapiens

Patentin PCT EASY BR75585.ST25

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(51)

<223>

<400> 23

ctc	ata	gag	gag	gac	ccc	tcc	tca	gaa	gaa	ggg	cgg	cag	gag	cta	tcc	48
Leu	Ile	Glu	Glu	Asp	Pro	Ser	Ser	Glu	Glu	Gly	Arg	Gln	Glu	Leu	Ser	
1				5					10					15		

cac

His

51

<210> 24

<211> 408

<212> DNA

<213> Homo Sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(408)

<223>

<400> 24

agc	atg	ggg	aag	ggc	tac	tat	ctc	aag	ggg	aag	att	ggc	aaa	gtg	ccc	48
Ser	Met	Gly	Lys	Gly	Tyr	Tyr	Leu	Lys	Gly	Lys	Ile	Gly	Lys	Val	Pro	
1				5					10					15		

gtg	agg	ttc	ctg	gtg	gac	tct	ggg	gcc	cag	gtc	tct	gtg	gtc	cac	cca	96
Val	Arg	Phe	Leu	Val	Asp	Ser	Gly	Ala	Gln	Val	Ser	Val	Val	His	Pro	
			20					25					30			

aac	ttg	tgg	gag	gag	gtc	act	gat	ggc	gat	ctg	gac	acc	ctg	cag	ccc	144
Asn	Leu	Trp	Glu	Glu	Val	Thr	Asp	Gly	Asp	Leu	Asp	Thr	Leu	Gln	Pro	
		35					40					45				

ttt	gag	aat	gtg	gta	aag	gtg	gcc	aat	ggg	gct	gaa	atg	aag	atc	ctg	192
Phe	Glu	Asn	Val	Val	Lys	Val	Ala	Asn	Gly	Ala	Glu	Met	Lys	Ile	Leu	
	50					55					60					

ggg	gtc	tgg	gat	aca	gcg	gtg	tcc	cta	ggc	aag	ctg	aag	ctg	aag	gca	240
Gly	Val	Trp	Asp	Thr	Ala	Val	Ser	Leu	Gly	Lys	Leu	Lys	Leu	Lys	Ala	
65					70					75					80	

cag	ttc	cta	gtg	gcc	aat	gcg	agt	gcc	gag	gaa	gcc	atc	att	ggc	act	288
Gln	Phe	Leu	Val	Ala	Asn	Ala	Ser	Ala	Glu	Glu	Ala	Ile	Ile	Gly	Thr	
				85					90					95		

gat	gtg	ctc	cag	gac	cac	aat	gct	atc	ctg	gac	ttt	gag	cac	cgc	aca	336
Asp	Val	Leu	Gln	Asp	His	Asn	Ala	Ile	Leu	Asp	Phe	Glu	His	Arg	Thr	
			100					105					110			

tcg	acc	ctg	aaa	ggg	aag	aag	ttt	cgc	ctt	ctg	cct	gtg	gga	ggg	tcc	384
Ser	Thr	Leu	Lys	Gly	Lys	Lys	Phe	Arg	Leu	Leu	Pro	Val	Gly	Gly	Ser	
		115					120					125				

ctg	gaa	gat	gag	ttt	gac	ctg	gag									408
Leu	Glu	Asp	Glu	Phe	Asp	Leu	Glu									
	130					135										

<210> 25

<211> 172

Patentin PCT EASY BR75585.ST25

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 25

```

Leu Leu Lys Ala Phe Gly Val Pro Gly Ala Ala Pro Ser His Leu Pro
1      5      10      15
Lys Glu Ile Val Met Gly Lys Gly Tyr Tyr Leu Lys Gly Lys Ile Gly
20      25      30
Lys Val Pro Val Arg Phe Leu Val Asp Ser Gly Ala Gln Val Ser Val
35      40      45
Val His Pro Asn Leu Trp Glu Glu Val Thr Asp Gly Asp Leu Asp Thr
50      55      60
Leu Gln Pro Phe Glu Asn Val Val Lys Val Ala Asn Gly Ala Glu Met
65      70      75      80
Lys Ile Leu Gly Val Trp Asp Thr Ala Val Ser Leu Gly Lys Leu Lys
85      90      95
Leu Lys Ala Gln Phe Leu Val Ala Asn Ala Ser Ala Glu Glu Ala Ile
100     105     110
Ile Gly Thr Asp Val Leu Gln Asp His Asn Ala Ile Leu Asp Phe Glu
115     120     125
His Arg Thr Cys Thr Leu Lys Gly Lys Lys Phe Arg Leu Leu Pro Val
130     135     140
Gly Gly Ser Leu Glu Asp Glu Phe Asp Leu Glu Leu Ile Glu Glu Asp
145     150     155     160
Pro Ser Ser Glu Glu Gly Arg Gln Glu Leu Ser His
165     170

```

<210> 26

<211> 516

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(516)

<223>

<400> 26

```

ctc ctg aag gcc ttt ggg gtc cct ggg gct gcc ccc agc cac ctg ccc
Leu Leu Lys Ala Phe Gly Val Pro Gly Ala Ala Pro Ser His Leu Pro
1      5      10      15
aaa gag atc gtc atg ggt aag ggc tac tat ctc aag ggg aag att ggc
Lys Glu Ile Val Met Gly Lys Gly Tyr Tyr Leu Lys Gly Lys Ile Gly
96

```

48

96

Patentin PCT EASY BR75585.ST25
25 30

20

aaa	gtg	ccc	gtg	agg	ttc	ctg	gtg	gac	tct	ggg	gcc	cag	gtc	tct	gtg	144
Lys	Val	Pro	Val	Arg	Phe	Leu	Val	Asp	Ser	Gly	Ala	Gln	Val	Ser	Val	
		35					40					45				
gtc	cac	cca	aac	ttg	tgg	gag	gag	gtc	act	gat	ggc	gat	ctg	gac	acc	192
Val	His	Pro	Asn	Leu	Trp	Glu	Glu	Val	Thr	Asp	Gly	Asp	Leu	Asp	Thr	
	50					55				60						
ctg	cag	ccc	ttt	gag	aat	gtg	gta	aag	gtg	gcc	aat	ggt	gct	gaa	atg	240
Leu	Gln	Pro	Phe	Glu	Asn	Val	Val	Lys	Val	Ala	Asn	Gly	Ala	Glu	Met	
65				70					75					80		
aag	atc	ctg	ggt	gtc	tgg	gat	aca	gcg	gtg	tcc	cta	ggc	aag	ctg	aag	288
Lys	Ile	Leu	Gly	Val	Trp	Asp	Thr	Ala	Val	Ser	Leu	Gly	Lys	Leu	Lys	
			85						90					95		
ctg	aag	gca	cag	ttc	cta	gtg	gcc	aat	gcg	agt	gcc	gag	gaa	gcc	atc	336
Leu	Lys	Ala	Gln	Phe	Leu	Val	Ala	Asn	Ala	Ser	Ala	Glu	Glu	Ala	Ile	
			100					105					110			
att	ggc	act	gat	gtg	ctc	cag	gac	cac	aat	gct	atc	ctg	gac	ttt	gag	384
Ile	Gly	Thr	Asp	Val	Leu	Gln	Asp	His	Asn	Ala	Ile	Leu	Asp	Phe	Glu	
	115						120					125				
cac	cgc	aca	tgc	acc	ctg	aaa	ggg	aag	aag	ttt	cgc	ctt	ctg	cct	gtg	432
His	Arg	Thr	Cys	Thr	Leu	Lys	Gly	Lys	Lys	Phe	Arg	Leu	Leu	Pro	Val	
	130					135					140					
gga	ggg	tcc	ctg	gaa	gat	gag	ttt	gac	ctg	gag	ctc	ata	gag	gag	gac	480
Gly	Gly	Ser	Leu	Glu	Asp	Glu	Phe	Asp	Leu	Glu	Leu	Ile	Glu	Glu	Asp	
145					150					155					160	
ccc	tcc	tca	gaa	gaa	ggg	cgg	cag	gag	cta	tcc	cac					516
Pro	Ser	Ser	Glu	Glu	Gly	Arg	Gln	Glu	Leu	Ser	His					
				165					170							

<210> 27

<211> 155

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 27

Leu	Leu	Lys	Ala	Phe	Gly	Val	Pro	Gly	Ala	Ala	Pro	Ser	His	Leu	Pro	
1				5					10					15		
Lys	Glu	Ile	Val	Met	Gly	Lys	Gly	Tyr	Tyr	Leu	Lys	Gly	Lys	Ile	Gly	
			20					25					30			
Lys	Val	Pro	Val	Arg	Phe	Leu	Val	Asp	Ser	Gly	Ala	Gln	Val	Ser	Val	
		35					40					45				
Val	His	Pro	Asn	Leu	Trp	Glu	Glu	Val	Thr	Asp	Gly	Asp	Leu	Asp	Thr	
	50					55				60						
Leu	Gln	Pro	Phe	Glu	Asn	Val	Val	Lys	Val	Ala	Asn	Gly	Ala	Glu	Met	
65				70						75				80		
Lys	Ile	Leu	Gly	Val	Trp	Asp	Thr	Ala	Val	Ser	Leu	Gly	Lys	Leu	Lys	
			85						90					95		

Patentin PCT EASY BR75585.ST25

Leu Lys Ala Gln Phe Leu Val Ala Asn Ala Ser Ala Glu Glu Ala Ile
 100 105 110
 Ile Gly Thr Asp Val Leu Gln Asp His Asn Ala Ile Leu Asp Phe Glu
 115 120 125
 His Arg Thr Cys Thr Leu Lys Gly Lys Lys Phe Arg Leu Leu Pro Val
 130 135 140
 Gly Gly Ser Leu Glu Asp Glu Phe Asp Leu Glu
 145 150 155

<210> 28

<211> 465

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(465)

<223>

<400> 28

ctc ctg aag gcc ttt ggg gtc cct ggg gct gcc ccc agc cac ctg ccc	48
Leu Leu Lys Ala Phe Gly Val Pro Gly Ala Ala Pro Ser His Leu Pro	
1 5 10 15	
aaa gag atc gtc atg ggt aag ggc tac tat ctc aag ggg aag att ggc	96
Lys Glu Ile Val Met Gly Lys Gly Tyr Tyr Leu Lys Gly Lys Ile Gly	
20 25 30	
aaa gtg ccc gtg agg ttc ctg gtg gac tct ggg gcc cag gtc tct gtg	144
Lys Val Pro Val Arg Phe Leu Val Asp Ser Gly Ala Gln Val Ser Val	
35 40 45	
gtc cac cca aac ttg tgg gag gag gtc act gat ggc gat ctg gac acc	192
Val His Pro Asn Leu Trp Glu Glu Val Thr Asp Gly Asp Leu Asp Thr	
50 55 60	
ctg cag ccc ttt gag aat gtg gta aag gtg gcc aat ggt gct gaa atg	240
Leu Gln Pro Phe Glu Asn Val Val Lys Val Ala Asn Gly Ala Glu Met	
65 70 75 80	
aag atc ctg ggt gtc tgg gat aca gcg gtg tcc cta ggc aag ctg aag	288
Lys Ile Leu Gly Val Trp Asp Thr Ala Val Ser Leu Gly Lys Leu Lys	
85 90 95	
ctg aag gca cag ttc cta gtg gcc aat gcg agt gcc gag gaa gcc atc	336
Leu Lys Ala Gln Phe Leu Val Ala Asn Ala Ser Ala Glu Glu Ala Ile	
100 105 110	
att ggc act gat gtg ctc cag gac cac aat gct atc ctg gac ttt gag	384
Ile Gly Thr Asp Val Leu Gln Asp His Asn Ala Ile Leu Asp Phe Glu	
115 120 125	
cac cgc aca tgc acc ctg aaa ggg aag aag ttt cgc ctt ctg cct gtg	432
His Arg Thr Cys Thr Leu Lys Gly Lys Lys Phe Arg Leu Leu Pro Val	
130 135 140	

Patentin PCT EASY BR75585.ST25

gga ggg tcc ctg gaa gat gag ttt gac ctg gag
Gly Gly Ser Leu Glu Asp Glu Phe Asp Leu Glu
145 150 155

465

<210> 29

<211> 4

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 29
Phe Ala Asn Ser
1

<210> 30

<211> 6

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 30
Asp Leu Glu Leu Ile Glu
1 5

<210> 31

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 31
Glu Phe Asp Leu Glu Leu Ile Glu Glu Asp
1 5 10

<210> 32

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 32
Glu Phe Asp Leu Asp Leu Ile Glu Glu Asp
1 5 10

<210> 33

Patentin PCT EASY BR75585.ST25

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 33

Glu Phe Asp Leu Asp Leu Ile Glu Trp Asp
1 5 10

<210> 34

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 34

Glu Phe Asp Leu Asp Leu Ile His Trp Asp
1 5 10

<210> 35

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 35

Glu Pro Asn Leu Asp Leu Ile Glu Glu Asp
1 5 10

<210> 36

<211> 255

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 36

Met Ala Gly Ser Gly Ala Arg Ser Glu Glu Gly Arg Arg Gln His Ala
1 5 10 15Phe Val Pro Glu Pro Phe Asp Gly Ala Asn Val Val Pro Asn Leu Trp
20 25 30Leu His Ser Phe Glu Val Ile Asn Asp Leu Asn His Trp Asp His Ile
35 40 45Thr Lys Leu Arg Phe Leu Lys Glu Ser Leu Arg Gly Glu Ala Leu Gly
50 55 60Val Tyr Asn Arg Leu Ser Pro Gln Asp Gln Gly Asp Tyr Gly Thr Val
65 70 75 80

Patentin PCT EASY BR75585.ST25

Lys Glu Ala Leu Leu Lys Ala Phe Gly Val Pro Gly Ala Ala Pro Ser
 85 90 95
 His Leu Pro Lys Glu Ile Val Met Gly Lys Gly Tyr Tyr Leu Lys Gly
 100 105 110
 Lys Ile Gly Lys Val Pro Val Arg Phe Leu Val Asp Ser Gly Ala Gln
 115 120 125
 Val Ser Val Val His Pro Asn Leu Trp Glu Glu Val Thr Asp Gly Asp
 130 135 140
 Leu Asp Thr Leu Gln Pro Phe Glu Asn Val Val Lys Val Ala Asn Gly
 145 150 155 160
 Ala Glu Met Lys Ile Leu Gly Val Trp Asp Thr Ala Val Ser Leu Gly
 165 170 175
 Lys Leu Lys Leu Lys Ala Gln Phe Leu Val Ala Asn Ala Ser Ala Glu
 180 185 190
 Glu Ala Ile Ile Gly Thr Asp Val Leu Gln Asp His Asn Ala Ile Leu
 195 200 205
 Asp Phe Glu His Arg Thr Cys Thr Leu Lys Gly Lys Lys Phe Arg Leu
 210 215 220
 Leu Pro Val Gly Gly Ser Leu Glu Asp Glu Phe Asp Leu Glu Leu Ile
 225 230 235 240
 Glu Glu Asp Pro Ser Ser Glu Glu Gly Arg Gln Glu Leu Ser His
 245 250 255

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/JP 03/02151

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 C07K14/47 C12N9/64 C12N15/52 C07K19/00 C07K16/40
 C07H21/00 A61K38/48 A61K31/711 A61P17/00 A61P31/00
 A61K48/00 A61K31/708

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C07K C12N A61K A61P C07H

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the International search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, EMBL, SEQUENCE SEARCH, BIOSIS, EMBASE, PAJ, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	SUGANO S ET AL: "HOMO SAPIENS CDNA FLJ25084 FIS, CLONE CBL08511" EMBL, XP002235474 the whole document	28-35, 39-41
X	ISOGAI T ET AL: "HOMO SAPIENS CDNA FLJ31432 FIS, CLONE NT2NE2000550" EMBL, XP002235475 abstract	28-35, 39-41
X	"1998 Biochemicals Catalog, PROTEASES FOR CLEAVAGE AND SEQUENCING" BOEHRINGER MANNHEIM BIOCHEMICALS CATALOG, XX, XX, 1998, pages 404-410, XP002235473 page 404 -page 410	15
-/-		

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

A document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

E earlier document but published on or after the international filing date

L document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

O document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

P document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

T later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

X document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

Y document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

& document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

27 November 2003

Date of mailing of the international search report

12/12/2003

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
 NL - 2280 HV Rijswijk
 Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
 Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Keller, Y

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

P R 03/02151

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>RAWLINGS N D ET AL: "FAMILIES OF ASPARTIC PEPTIDASES, AND THOSE OF UNKNOWN CATALYTIC MECHANISM"</p> <p>METHODS IN ENZYMOLOGY, ACADEMIC PRESS INC, SAN DIEGO, CA, US, vol. 248, 1995, pages 105-120, XP008003749</p> <p>ISSN: 0076-6879</p> <p>the whole document</p>	<p>28-35, 39-41</p>
X	<p>FR 2 761 363 A (OREAL)</p> <p>2 October 1998 (1998-10-02)</p> <p>page 2</p> <p>page 6</p> <p>page 7</p> <p>claims 13-34</p>	<p>1-13,15, 19-21, 23-35</p>
X	<p>US 6 274 364 B1 (BERNARD DOMINIQUE ET AL)</p> <p>14 August 2001 (2001-08-14)</p> <p>column 1 -column 3</p> <p>column 7</p>	<p>1-13,15, 19-21, 23-45</p>
X	<p>DE 199 50 020 A (HENKEL KGAA)</p> <p>19 April 2001 (2001-04-19)</p> <p>abstract</p> <p>page 2</p> <p>claims 1-9</p>	<p>1-13,15, 19-21, 23-45</p>
X	<p>US 5 545 402 A (WATKINSON ALLAN)</p> <p>13 August 1996 (1996-08-13)</p> <p>abstract</p> <p>column 1 -column 2</p> <p>claims 1-8</p>	<p>1-13,15, 19-21, 23-45</p>
X	<p>WO 02 22101 A (TRANI MARINA ;PREY CONOR JAMES O (GB); WEISGERBER DAVID JOHN (US);)</p> <p>21 March 2002 (2002-03-21)</p> <p>abstract</p> <p>page 2</p> <p>page 6 -page 12</p>	<p>1-13,15, 19-21, 23-45</p>

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/JP 03/02151

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
FR 2761363	A	02-10-1998	FR 2761362 A1	02-10-1998
			FR 2761363 A1	02-10-1998
			AU 7337998 A	22-10-1998
			EP 0972042 A1	19-01-2000
			WO 9844105 A1	08-10-1998
			JP 2001511019 T	07-08-2001
			US 6645509 B1	11-11-2003
US 6274364	B1	14-08-2001	FR 2767833 A1	05-03-1999
			CA 2243633 A1	28-02-1999
			EP 0899330 A1	03-03-1999
			JP 11139933 A	25-05-1999
			US 2002006654 A1	17-01-2002
DE 19950020	A	19-04-2001	DE 19950020 A1	19-04-2001
			AU 1022501 A	30-04-2001
			WO 0128536 A2	26-04-2001
			EP 1221948 A2	17-07-2002
US 5545402	A	13-08-1996	AU 7695394 A	03-04-1995
			CA 2168869 A1	23-03-1995
			WO 9507686 A1	23-03-1995
			EP 0719134 A1	03-07-1996
			NZ 273599 A	24-04-1997
			ZA 9407138 A	15-03-1996
WO 0222101	A	21-03-2002	WO 0222101 A1	21-03-2002
			AU 7482500 A	26-03-2002
			EP 1317248 A1	11-06-2003
			US 2003206896 A1	06-11-2003

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale No

PO 03/02151

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE

CIB 7	C07K14/47	C12N9/64	C12N15/52	C07K19/00	C07K16/40
	C07H21/00	A61K38/48	A61K31/711	A61P17/00	A61P31/00
	A61K48/00	A61K31/708			

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)

CIB 7 C07K C12N A61K A61P C07H

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés)

EPO-Internal, EMBL, SEQUENCE SEARCH, BIOSIS, EMBASE, PAJ, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	SUGANO S ET AL: "HOMO SAPIENS CDNA FLJ25084 FIS, CLONE CBL08511" EMBL, XP002235474 le document en entier	28-35, 39-41
X	ISOGAI T ET AL: "HOMO SAPIENS CDNA FLJ31432 FIS, CLONE NT2NE2000550" EMBL, XP002235475 abrégé	28-35, 39-41
X	"1998 Biochemicals Catalog, PROTEASES FOR CLEAVAGE AND SEQUENCING" BOEHRINGER MANNHEIM BIOCHEMICALS CATALOG, XX, XX, 1998, pages 404-410, XP002235473 page 404 -page 410	15

-/-

☒ Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

☒ Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

* Catégories spéciales de documents cités:

- *A* document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- *E* document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- *L* document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- *O* document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- *P* document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

- *T* document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention
- *X* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément
- *Y* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier
- *Z* document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

27 novembre 2003

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

12/12/2003

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale

Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Keller, Y

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale No

PCT/FR 03/02151

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	<p>RAWLINGS N D ET AL: "FAMILIES OF ASPARTIC PEPTIDASES, AND THOSE OF UNKNOWN CATALYTIC MECHANISM"</p> <p>METHODS IN ENZYMOLOGY, ACADEMIC PRESS INC, SAN DIEGO, CA, US,</p> <p>vol. 248, 1995, pages 105-120, XP008003749</p> <p>ISSN: 0076-6879</p> <p>le document en entier</p>	<p>28-35,</p> <p>39-41</p>
X	<p>FR 2 761 363 A (OREAL)</p> <p>2 octobre 1998 (1998-10-02)</p> <p>page 2</p> <p>page 6</p> <p>page 7</p> <p>revendications 13-34</p>	<p>1-13,15,</p> <p>19-21,</p> <p>23-35</p>
X	<p>US 6 274 364 B1 (BERNARD DOMINIQUE ET AL)</p> <p>14 août 2001 (2001-08-14)</p> <p>colonne 1 -colonne 3</p> <p>colonne 7</p>	<p>1-13,15,</p> <p>19-21,</p> <p>23-45</p>
X	<p>DE 199 50 020 A (HENKEL KGAA)</p> <p>19 avril 2001 (2001-04-19)</p> <p>abrégé</p> <p>page 2</p> <p>revendications 1-9</p>	<p>1-13,15,</p> <p>19-21,</p> <p>23-45</p>
X	<p>US 5 545 402 A (WATKINSON ALLAN)</p> <p>13 août 1996 (1996-08-13)</p> <p>abrégé</p> <p>colonne 1 -colonne 2</p> <p>revendications 1-8</p>	<p>1-13,15,</p> <p>19-21,</p> <p>23-45</p>
X	<p>WO 02 22101 A (TRANI MARINA ;PREY CONOR JAMES O (GB); WEISGERBER DAVID JOHN (US);)</p> <p>21 mars 2002 (2002-03-21)</p> <p>abrégé</p> <p>page 2</p> <p>page 6 -page 12</p>	<p>1-13,15,</p> <p>19-21,</p> <p>23-45</p>

SUITE DES RENSEIGNEMENTS INDIQUES SUR PCT/ISA/ 210

Suite du cadre I.2

Revendications nos.: 14, 16-18, 22

Les revendications 14, 16-18, 22 présentes ont trait à une très grande variété de composés/produits/dispositifs/méthodes. Un fondement au sens de L'Article 6 PCT et/ou un exposé au sens de l'Article 5 PCT ne peut cependant être trouvé que pour un nombre très restreint de ces composés/produits/dispositifs/méthodes revendiqué(e)s. Dans le cas présent, les revendications manquent à un tel point de fondement et l'exposé de l'invention dans la description est si limité qu'une recherche significative couvrant tout le spectre revendiqué est impossible.

L'attention du déposant est attirée sur le fait que les revendications, ou des parties de revendications, ayant trait aux inventions pour lesquelles aucun rapport de recherche n'a été établi ne peuvent faire obligatoirement l'objet d'un rapport préliminaire d'examen (Règle 66.1(e) PCT). Le déposant est averti que la ligne de conduite adoptée par l'OEB agissant en qualité d'administration chargée de l'examen préliminaire international est, normalement, de ne pas procéder à un examen préliminaire sur un sujet n'ayant pas fait l'objet d'une recherche. Cette attitude restera inchangée, indépendamment du fait que les revendications aient ou n'aient pas été modifiées, soit après la réception du rapport de recherche, soit pendant une quelconque procédure sous le Chapitre II.

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale n°
PCT/FR 03/02151

Cadre I Observations – lorsqu'il a été estimé que certaines revendications ne pouvaient pas faire l'objet d'une recherche (suite du point 1 de la première feuille)

Conformément à l'article 17.2)a), certaines revendications n'ont pas fait l'objet d'une recherche pour les motifs suivants:

1. ☐ Les revendications n^{os} se rapportent à un objet à l'égard duquel l'administration n'est pas tenue de procéder à la recherche, à savoir:

2. ☒ Les revendications n^{os} 14, 16-18, 22 se rapportent à des parties de la demande internationale qui ne remplissent pas suffisamment les conditions prescrites pour qu'une recherche significative puisse être effectuée, en particulier:
voir feuille supplémentaire SUITE DES RENSEIGNEMENTS PCT/ISA/210

3. ☐ Les revendications n^{os} sont des revendications dépendantes et ne sont pas rédigées conformément aux dispositions de la deuxième et de la troisième phrases de la règle 6.4.a).

Cadre II Observations – lorsqu'il y a absence d'unité de l'invention (suite du point 2 de la première feuille)

L'administration chargée de la recherche internationale a trouvé plusieurs inventions dans la demande internationale, à savoir:

1. ☐ Comme toutes les taxes additionnelles ont été payées dans les délais par le déposant, le présent rapport de recherche internationale porte sur toutes les revendications pouvant faire l'objet d'une recherche.

2. ☐ Comme toutes les recherches portant sur les revendications qui s'y prêtaient ont pu être effectuées sans effort particulier justifiant une taxe additionnelle, l'administration n'a sollicité le paiement d'aucune taxe de cette nature.

3. ☐ Comme une partie seulement des taxes additionnelles demandées a été payée dans les délais par le déposant, le présent rapport de recherche internationale ne porte que sur les revendications pour lesquelles les taxes ont été payées, à savoir les revendications n^{os}

4. ☐ Aucune taxe additionnelle demandée n'a été payée dans les délais par le déposant. En conséquence, le présent rapport de recherche internationale ne porte que sur l'invention mentionnée en premier lieu dans les revendications; elle est couverte par les revendications n^{os}

Remarque quant à la réserve

- ☐ Les taxes additionnelles étaient accompagnées d'une réserve de la part du déposant.
- ☐ Le paiement des taxes additionnelles n'était assorti d'aucune réserve.

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Demande internationale No

PCT/FR 03/02151

Document brevet cité au rapport de recherche		Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
FR 2761363	A	02-10-1998	FR 2761362 A1	02-10-1998
			FR 2761363 A1	02-10-1998
			AU 7337998 A	22-10-1998
			EP 0972042 A1	19-01-2000
			WO 9844105 A1	08-10-1998
			JP 2001511019 T	07-08-2001
			US 6645509 B1	11-11-2003
US 6274364	B1	14-08-2001	FR 2767833 A1	05-03-1999
			CA 2243633 A1	28-02-1999
			EP 0899330 A1	03-03-1999
			JP 11139933 A	25-05-1999
			US 2002006654 A1	17-01-2002
DE 19950020	A	19-04-2001	DE 19950020 A1	19-04-2001
			AU 1022501 A	30-04-2001
			WO 0128536 A2	26-04-2001
			EP 1221948 A2	17-07-2002
US 5545402	A	13-08-1996	AU 7695394 A	03-04-1995
			CA 2168869 A1	23-03-1995
			WO 9507686 A1	23-03-1995
			EP 0719134 A1	03-07-1996
			NZ 273599 A	24-04-1997
			ZA 9407138 A	15-03-1996
WO 0222101	A	21-03-2002	WO 0222101 A1	21-03-2002
			AU 7482500 A	26-03-2002
			EP 1317248 A1	11-06-2003
			US 2003206896 A1	06-11-2003